ANTIBIOTIKA AUS BASIDIOMYCETEN DER GATTUNGEN CRINIPELLIS, FLAGELLOSCYPHA, HALOCYPHINA, LACHNELLA, MARASMIUS UND PLEUROTELLUS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

JUTTA KUPKA, geb. Helbig

aus Gießen

1980

ANTIBIOTIKA AUS BASIDIOMYCETEN DER GATTUNGEN CRINIPELLIS, FLAGELLOSCYPHA, HALOCYPHINA, LACHNELLA, MARASMIUS UND PLEUROTELLUS

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

JUTTA KUPKA, geb. Helbig

aus Gießen

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung : 13.3.1980

Dekan : Professor Dr. W. Seyffert

1. Berichterstatter : P.D. Dr. T. Anke

2. Berichterstatter : Professor Dr. H. Zähner

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn P.D. Dr. T. Anke am Institut für Biologie I, Lehrbereich Spezielle Botanik, der Universität Tübingen durchgeführt. Ihm möchte ich für die Überlassung des Themas, seine ständige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie die Vermittlung des USA-Aufenthalts recht herzlich danken.

Herrn Professor Dr. F. Oberwinkler danke ich für die freundliche Überlassung einiger Stämme aus der Stammsammlung des Lehrstuhls Spezielle Botanik sowie für die amerikanischen Basidiomyceten-Aufsammlungen.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. F. Lipmann, Rockefeller Universität, New York, für die Einladung in sein Labor sowie seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche an Hühnerembryo-Fibroblasten.

Die Strukturermittlung der isolierten Antibiotika liegt in den Händen von Herrn Professor Dr. W. Steglich, Institut für Organische Chemie der Universität Bonn. Für die bereits vorliegenden Strukturen, spektroskopischen Daten sowie die Herstellung von Derivaten möchte ich ihm und seinen Mitarbeitern Herrn Dr. L. Zechlin, Herrn G. Schramm und Herrn B.M. Giannetti recht herzlich danken.

Herr Professor Dr. F. Bohlmann, Technische Universität Berlin, überließ mir freundlicherweise eine Anzahl neuer Sesquiterpen-Vergleichssubstanzen.

Allen Mitarbeitern im Projekt V des Sonderforschungsbereichs 76 danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Verwendete Abkürzungen:

AIB	α-Aminoisobuttersäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dATP	Desoxy-adenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxy-cytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxy-guanosin-5'-triphosphat
dTTP	Thymidin-5'-triphosphat
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
I.E.	Internationale Einheiten
IES	Indolessigsäure (Auxin)
LD_{50}	letale Dosis für 50 % der Versuchstiere
MHK	Minimale Hemmkonzentration
NAD, NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidiert und reduziert
OD	Optische Dichte bei λ = 650 nm und 1 cm Schichtdicke
PEI	Polyäthylenimin
rpm	revolutions per minute
RSV	Rous-Sarcoma-Virus
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	units
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat

ATCC	American Type Culture Collection, Rockville, Maryland
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Niederlande
TÜ	Stammsammlung des Instituts für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I
Herb. FO	Herbar F. Oberwinkler
Herb. JK	Herbar J. Kupka
Herb. RA	Herbar R. Agerer
Herb. TA	Herbar T. Anke

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548921_0012

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	4
2.1.	Chemikalien und Enzyme	4
2.2.	Medien	6
2.3.	Organismen	7
2.3.1.	Untersuchte Basidiomyceten-Stämme	7
2.3.2.	Teststämme	11
2.4.	Methoden zur Herstellung der Antibiotika	12
2.4.1.	Inkulturnahme der Stämme	12
2.4.2.	Fermentation	12
2.4.3.	Isolierung und Reinigung der Antibiotika	13
2.5.	Methoden zur chemisch-physikalischen Charakterisierung	14
2.6.	Methoden zur biologischen Charakterisierung	15
2.6.1.	Agardiffusionstest	15
2.6.2.	Wachstumskurven von Pilzen	15
2.6.3.	Reihenverdünnungstest	15
2.6.4.	Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen	16
2.6.4.1.	Ehrlich Ascites Carcinom	16
2.6.4.2.	*Bacillus brevis* und *subtilis*	17
2.6.5.	Aufnahme von radioaktiv markierten Vorstufen	17
2.6.5.1.	Ehrlich Ascites Carcinom	17
2.6.5.2.	*Bacillus brevis*	18
2.6.6.	Einbau und Aufnahme radioaktiv markierten Vorstufen in Hühnerembryo-Fibroblasten	18
2.6.7.	Bestimmung der säurelöslichen Uridin-Nucleotide in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms	20
2.6.8.	RNA-Synthese mit isolierten Zellkernen des Ehrlich Ascites Carcinoms	20
2.6.9.	DNA-Synthese mit Toluol-behandelten Zellen von *Bacillus brevis*	21
2.6.10.	Sauerstoffaufnahme und oxidative Phosphorylierung in Rattenleber-Mitochondrien	22

2.6.11.	Mutagenität im Ames-Test	23
2.6.12.	Biomimetische Versuche mit Cystein	23
2.6.13.	Test der Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe in vitro	23
2.6.14.	Hämolyse-Test	24
2.6.15.	Phytotoxizitäts-Versuche	24
2.6.16.	RNA-Synthese mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* in vitro	25
3.	ERGEBNISSE	26
3.1.	Screening und Auswahl der Produzentenstämme	26
3.2.	Fermentation	28
3.3.	Isolierung und Reinigung der Antibiotika	29
3.4.	Physikalisch-chemische Charakterisierung	31
3.5.	Daten zur Struktur der Antibiotika	39
3.5.1.	Crinipellin	39
3.5.2.	Marasminsäure	39
3.5.3.	Siccayne	40
3.5.4.	Scorodonin	40
3.5.5.	K-322	40
3.5.6.	K-24375/1, K-24375/2 und K-24375/3	41
3.6.	Biologische Charakterisierung der Antibiotika	41
3.6.1.	Wirkungsspektren	42
3.6.2.	Einfluß auf die Makromolekülsynthesen in vivo	46
3.6.2.1.	*Bacillus brevis* und *subtilis*	46
3.6.2.2.	Ehrlich Ascites Carcinom	47
3.6.2.3.	RSV-transformierte und nicht-transformierte Hühnerembryo-Fibroblasten	51
3.6.3.	Einfluß auf die Aufnahme von Vorstufen der Makromolekülsynthesen in vivo	56
3.6.4.	Wirkung auf die RNA- und DNA-Synthese in vitro	57
3.6.4.1.	RNA-Synthese in isolierten Zellkernen des Ehrlich Ascites Carcinoms	57
3.6.4.2.	DNA-Synthese in Toluol-behandelten Zellen von *Bacillus brevis*	59
3.6.5.	Hämolyse-Test	60
3.6.6.	Prüfung auf mutagene Eigenschaften	60

3.7.	Weiterführende Untersuchungen zur Wirkungsweise von Crinipellin, Marasminsäure, Scorodonin und K-24375/3	62
3.7.1.	Crinipellin	62
3.7.1.1.	Einfluß auf den Sauerstoffverbrauch und die oxidative Phosphorylierung isolierter Rattenlebermitochondrien	62
3.7.1.2.	Vergleich von Uridin-Aufnahme und Einbau in *Bacillus brevis*-Zellen	64
3.7.1.3.	Wirkung auf den Transport verschiedener Vorstufen in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms	65
3.7.1.4.	Einfluß auf den Gehalt an säurelöslichen Uridin-Nucleotiden in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms	67
3.7.2.	Marasminsäure	69
3.7.3.	Scorodonin	70
3.7.3.1.	Einfluß auf das Wachstum von *Pythium debaryanum* und *Rhizoctonia solani*	70
3.7.3.2.	Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*	72
3.7.4.	K-24375/1, K-24375/2 und K-24375/3	73
3.7.4.1.	Vergleich der antibiotischen und Antitumor-Wirkung mit -Methylen- -Lacton-Sesquiterpenen aus Höheren Pflanzen	73
3.7.4.2.	Biomimetische Versuche mit Cystein	76
3.7.4.3.	Einfluß auf die Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe in vitro	78
3.7.4.4.	Hemmwirkung auf *Avena*-Koleoptil- und *Helianthus*-Hypocotyl-Segmente	79
4.	DISKUSSION	82
4.1.	Crinipellin	82
4.2.	K-322 aus *Flagelloscypha pilatii*	88
4.3.	Marasminsäure	89
4.4.	K-24375/1-3 aus *Pleurotellus hypnophilus*	93
4.5.	Siccayne	97

4.6.	Scorodonin	98
4.7.	Screening und Antibiotika-Produktion	99
5.	ZUSAMMENFASSUNG	102
6.	LITERATURVERZEICHNIS	105

1. EINLEITUNG

Die Schwierigkeiten, biologisch aktive Sekundärmetabolite mit neuer Struktur zu finden, werden zunehmend größer. Lösungen bieten sich in der Entwicklung neuer Screeningmodelle oder im Übergang zu außergewöhnlichen Produzentengruppen.

Bereits in den 50er Jahren erweiterte UMEZAWA den klassischen Wachstumshemmtest nach WAKSMAN durch ein Anti-Tumor-Screening und isolierte eine Vielzahl neuer Metabolite (UMEZAWA, 1979). Hemmstoffe mit sehr spezifischer Funktion wurden durch den Einsatz mehrerer in-vitro Enzymtests gefunden (FROMMER et al., 1979). Insgesamt gesehen scheint die Suche nach neuen Metaboliten - vor allem bei den bereits gut untersuchten Actinomycetales - durch die laufende Weiterentwicklung bestehender Screeningverfahren und die Ergänzung durch neue Test-Methoden (ZÄHNER, 1977, 1978) auch in Zukunft erfolgversprechend.

Andere Produzentengruppen rückten erst in jüngster Zeit wieder in den Vordergrund des Interesses. Unter den Prokaryonten sind hier Myxobakterien erwähnenswert (RINGEL et al., 1977; RINGEL, 1978; Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, 1978), unter den Eukaryonten vor allem Basidiomyceten. Einer der Gründe für ihre bisherige Vernachlässigung ist sicherlich in der - verglichen mit Actinomycetales oder Eurotiales - aufwendigeren Submerskultur zu suchen.

In den Anfangsjahren der Antibiotika-Forschung wurden auch Basidiomyceten einem umfangreichen Screening auf antibakterielle Metabolite unterworfen (HERVEY, 1947; FLOREY et al., 1949), jedoch selten die für die antibiotische Wirkung verantwortliche Substanz isoliert und in ihrer Struktur aufgeklärt. Die bis 1977 bekanntgewordenen Antibiotika aus Basidiomyceten hat ANKE (1978) zusammengefaßt. Seither wurden folgende weitere Substanzen mit Struktur publiziert: Cortalcerone A (BAUTE et al., 1976), Merulinsäuren A, B und C und Merulidial (QUACK, 1978; GIANNETTI et al., 1978), Adustin (ZHU et al., 1978), Lepiochlorin (NAIR et al., 1979), Gunacin (WERNER et al., 1979), Oudemansin (ANKE et al., 1979) sowie Schizonellin A und B (DEML et al., 1980).

Vor allem japanische Arbeitsgruppen untersuchen zur Zeit Basidiomyceten - Kulturen in einem umfangreichen Antitumor-Screening. Aus der Gruppe der dabei isolierten tumorhemmenden Glucane, deren bekanntester Vertreter das Lentinan ist (SAITO et al., 1977), liegen bereits über 40 Patente von Polysaccharid-Präparaten aus Basidiomyceten verschiedenster systematischer Zugehörigkeit vor.

Ein Antibiotikum aus Basidiomyceten, das in der Praxis zur Behandlung von Infektionen mit Gram-positiven Bakterien angewendet wird, ist Tiamulin (81.723 HFU), ein semisynthetisches Derivat des Pleuromutilins (DREWS et al., 1975; WERNER et al., 1978).

Aufgrund seiner Immunabwehr - steigernden Eigenschaften könnte Diketocoriolin B, das Derivat von Coriolin B aus *Coriolus consors*, für einen Einsatz in der Tumor-Therapie geeignet sein (ISHIZUKA et al., 1972).

Diese ersten Ergebnisse sind erfolgversprechend, so daß die Inkulturnahme und Bearbeitung weiterer Basidiomyceten-Stämme lohnend erscheint. Isolierte Substanzen sollten insbesondere auf ihre Anti-Tumor-Eigenschaften überprüft werden.

Den Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit bildeten "cyphelloide" Basidiomyceten mit winzigen, schüssel- bis röhrenförmigen Fruchtkörpern. Aus dieser Gruppe Höherer Pilze sind bisher weder systematisch Kulturen angelegt, noch Stoffwechselprodukte isoliert worden. Von DONK (1959) wurden sie zur künstlichen Familie *Cyphellaceae* Lotsy zusammengefaßt, die alle Homobasidiomyceten mit cyphelloidem Fruchtkörper einschließt, die "gegenüber dem Hymenium am Substrat angewachsen sind und die keine sterilen Elemente (Cystiden) an eventuell lamellenförmigen Aufwölbungen tragen". Heute wird der Begriff "cyphelloid" allgemeiner als Fruchtkörper-Organisationstyp verstanden, der in verschiedenen Verwandtschaftsbereichen - also auch bei Phragmobasidiomycetes - unabhängig voneinander erreicht worden ist (AGERER et OBERWINKLER, 1979).

Für einige der unter den *Cyphellaceae* (DONK, 1959) bzw. *Porotheleaceae* (COOKE, 1961) zusammengefaßten Gattungen konnten be-

reits Verwandtschaften zu verschiedenen Gruppen der Agaricales aufgezeigt werden, der Großteil cyphelloider Sippen ist hingegen noch nicht unter diesem Gesichtspunkt bearbeitet.

In der vorhergehenden Arbeit (KUPKA, 1978) wurde aus dem agaricalen Pilz *Crinipellis stipitaria* (Fr.) Pat. Crinipellin (K-7612) isoliert. *Crinipellis* Pat., innerhalb der *Tricholomataceae* in die Nähe von *Marasmius* Fr. und *Marasmiellus* Murr. zu stellen (SINGER, 1942, 1975), weist über das Bindeglied *Chaetocalathus* Sing. enge Beziehungen zu der cyphelloiden Gattung *Lachnella* Fr. auf, die von SINGER (1951) und DONK (1959) postuliert und von AGERER (1978) mit mikroskopischen Detailanalysen belegt wird. Lachnella ist ihrerseits über die Sektion *Lachnelloscypha* Agerer (AGERER, 1979) nahe mit der ebenfalls cyphelloiden Gattung *Flagelloscypha* Donk verwandt. Eine monographische Bearbeitung dieser Gattung liegt von AGERER vor (AGERER, 1975).

Den bisher einzigen marinen Basidiomyceten mit schüsselförmigem Fruchtkörper stellt *Halocyphina villosa* J. & E. Kohlmeyer dar (GINNS et MALLOCH, 1977), der nach Ansicht der Autoren aufgrund der hyalinen Sporen und der Form der Randhaare in die Nähe von *Henningsomyces* O.K. und *Rectipilus* Agerer (AGERER, 1973) zu stellen ist.

Cyphelloide Formen mit weißen Sporen gliedert SINGER (1975) als "reduced series" den *Tricholomataceae* an, solche mit braun gefärbten, z.T. warzigen Sporen - wie *Episphaeria* Donk, *Pellidiscus* Donk, *Cyphellopsis* Donk und andere - ordnet er in der Familie *Crepidotaceae* ein. Lamellentragende Vertreter dieser Gruppe sind vor allem die Gattungen *Crepidotus* Kummer und *Pleurotellus* Fayod, letztere ohne Schnallen und mit nur sehr schwach gefärbten Sporen (HORAK, 1968; SINGER, 1975).

Arten der genannten Gruppen mit agaricalem oder cyphelloidem Fruchtkörperbauplan sowie weitere Vertreter kleinerer Nachbargattungen sollten im Verlauf der vorliegenden Arbeit in Kultur genommen und auf die Bildung antibiotisch aktiver Metabolite geprüft werden. Auftretende antibiotische Aktivitäten sollten als Reinsubstanzen isoliert und in ihren chemisch-physikalischen sowie biologischen Eigenschaften näher charakterisiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. CHEMIKALIEN UND ENZYME

Niax Polyol	Brenntag GmbH, Mülheim
Desoxy-Nucleotide	Boehringer GmbH, Mülheim
Nucleotide	
Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidiert	
Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe	
DNA-abhängige RNA-Polymerase aus *Escherichia coli*	
Desoxyribonucleinsäure	
"Glucotest"-Harnzucker-Teststreifen	
Actinomycin D	Calbiochem, Los Angeles, USA
Glucose ("Dextropur")	Deutsche Maizenawerke, Hamburg
Antibiotic Medium 3	Difco Laboratories, Detroit, USA
Bacto Agar	
Bacto Corn meal agar	
Bacto Malt Extract	
Bacto Nutrient broth	
Bacto Peptone	
Bacto Yeast Extract	
Malzextrakt, "Löflund's"	Dr. Fränkle & Max Eck, Fellbach
Medium 199	Gibco, Grand Island, USA
Scherers Maintenance Solution	
Calf Serum	
Chicken Serum	
Sephadex LH-20	Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden

α-Amanitin	Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg
Brij 58	
Heparin-Natrium	
"Mallinckrodt"-Kieselgel, 100 mesh	
N'-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin	
Rifampicin Lepetit	
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	
Uridin	
Cycloheximid	Sigma Chemie GmbH, München
Quickszint 294	Zinsser Scintillators, Frankfurt
Quickszint 501	
^{14}C -Adenosin-5'-triphosphat, 556 mCi/mmol	The Radiochemical Centre, Amersham, England
D-(U-^{14}C)-Glucose, 330 mCi/mmol	
(1-^{14}C)-Leucin, 354 mCi/mmol	
(2-^{14}C)-Thymidin, 58 mCi/mmol	
(2-^{14}C)-Uracil, 59 mCi/mmol	
(5-^{3}H)-Uridin-5'-triphosphat, 1 Ci/mmol	
(8-^{14}C)-Adenosin, 58 mCi/mmol	New England Nuclear, Boston, USA
α-(1-^{14}C)-Aminoisobuttersäure, 51 Ci/mmol	
(5-^{3}H)-Cytidin, 27,7 Ci/mmol	
(6-^{3}H)-Desoxy-adenosin, 19,4 Ci/mmol	
(6-^{3}H)-Desoxy-cytidin, 15 Ci/mmol	
(Methyl-^{3}H)-Desoxy-thymidin-5'-triphosphat, 66,6 Ci/mmol	
(^{14}C(U)-Guanosin, 500 mCi/mmol	
(2-^{14}C)-Uridin, 25 mCi/mmol	
(4,5-^{3}H)-L-Leucin, 39 Ci/mmol	ICN Pharmaceuticals, Irvine, USA
(Methyl-^{3}H)-Thymidin, 6 Ci/mmol	
(5,6-^{3}H)-Uridin, 25 Ci/mmol	

2.2. MEDIEN

Die Medien wurden bei 121° C 15 Minuten, 10- und 20-Liter Ansätze 30 bzw. 35 Minuten autoklaviert.

Nährmedium 1 (für feste Nährböden zusätzlich 1,5 % Agar)

4	g	Hefeextrakt
10	g	Malzextrakt
4	g	Glucose
1	l	Leitungswasser

Für die Fermentation im 10- und 20-Liter Fermenter wurde der pH-Wert vor dem Autoklavieren mit HCl auf 5,8 eingestellt.

Nährmedium 2 (BAF-Medium nach MOSER, 1966; für feste Nährböden zusätzlich 1,5 % Agar)

20	g	Maltose
10	g	Glucose
2	g	Pepton
0,2	g	Hefeextrakt
0,5	g	KH_2PO_4
0,5	g	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$
10	mg	$FeCl_3$
1	mg	$ZnSO_4$
50	mg	$CaCl_2$
50	µg	Thiaminiumdichlorid
1	µg	Biotin
100	µg	Folsäure
50	µg	myo-Inosit
1	l	Entionisiertes Wasser

Nährmedium 3

1,7	%	Corn meal agar

Nährmedium 4 (für feste Nährböden zusätzlich 1,5 % Agar)

8	g	Nutrient broth
5	g	NaCl
1	l	Entionisiertes Wasser

Nährmedium 5

1,7 %	Antibiotic medium 3

Nährmedium 6 (Vogel-Bonner Medium E, modifiziert nach AMES et al., 1975)

20 g	Glucose
0,2 g	$MgSO_4 \times 7\ H_2O$
2 g	Zitronensäure
10 g	K_2HPO_4
1,8 g	$(NH_4)_2HPO_4$
1,8 g	Na_2HPO_4
15 g	Agar
1 l	Entionisiertes Wasser

Nährmedium 7 (modifiziert nach AMES et al., 1975)

0,6 %	Bacto Agar
0,5 %	NaCl
5 ml / 100 ml	Histidin-Biotin-Lösung: 1 mM L-Histidin, 1 mM Biotin

Nährmedium 8 (für feste Nährböden zusätzlich 1,5 % Agar)

20 g	Malzextrakt
1 l	Leitungswasser

2.3. ORGANISMEN

2.3.1. Untersuchte Basidiomyceten-Stämme

Nachfolgend sind die Aufsammlungen der untersuchten Basidiomyceten mit ihren Funddaten zusammengestellt. Die Bestimmung der Arten erfolgte nach DONK (1959), COOKE (1961), AGERER (1973 und 1975) und MOSER (1978). Von 40 Stämmen (25 Arten) wurden Kulturen angelegt; die Inkulturnahme von *Chromocyphella muscicola*, *Episphaeria fraxinicola*, *Pellidiscus pallidus* und *Woldmaria crocea* gelang bisher nicht.

Die Stämme TA wurden von T. ANKE, die Stämme FO von L. HOROWITZ isoliert.

Cephaloscypha morlichensis (W.B.Cke.) Agerer JK 504
Deutschland, Bayern, Oberjoch, Iseler,
13.9.78, R. AGERER (Herb. RA 8238)

Chromocyphella muscicola (Fr.) Donk JK 526
Deutschland, Bayern, Oberjoch, Wildbachtobel,
29.9.78 (Herb. JK 526)

Crinipellis stipitaria (Fr.) Pat. TA 7612
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Spitzberg,
18.9.76, T. ANKE (Herb. TA 7612)

Crinipellis stipitaria (Fr.) Pat. JK 313
Italien, Sizilien, Castellamare del Golfo,
Monte Inici, 1.4.77 (Herb. JK 313)

Crinipellis stipitaria (Fr.) Pat. JK 319
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen,
Waldhäuser-Ost, 21.6.77, H.-O. BARAL (Herb. JK 319)

Crinipellis stipitaria (Fr.) Pat. JK 364
Deutschland, Baden-Württemberg, Eningen,
21.8.77, T. ANKE (Herb. JK 364)

Crinipellis stipitaria (Fr.) Pat. JK 375
Deutschland, Baden-Württemberg, Deißlingen,
28.8.77, T. ANKE (Herb. JK 375)

Cyphellopsis anomala (Pers. ex Fr.) Donk JK 540
Kolumbien, Sierra Nevada de Santa Marta, San Toreno,
16.6.78, F. OBERWINKLER (Herb. FO 2677ob)

Episphaeria fraxinicola (Berk. & Br.) Donk JK 451
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen,
Heuberger Tor, 26.10.77 (Herb. JK 451)

Flagelloscypha minutissima (Burt) Donk JK 370
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen,
Eisenbachhain, 23.8.77 (Herb. JK 370)

Flagelloscypha minutissima (Burt) Donk JK 398
Österreich, Steiermark, St. Radegund bei Graz,
15.9.77 (Herb. JK 398)

Flagelloscypha minutissima (Burt) Donk JK 523
Österreich, Nassereit,
28.9.78 (Herb. JK 523)

Flagelloscypha pilatii Agerer JK 322
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen,
Waldhäuser-Ost, 28.6.77 (Herb. JK 322)

Flagelloscypha pilatii Agerer JK 330
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen,
Waldhäuser-Ost, 17.7.77 (Herb. JK 330)

Flagelloscypha pilatii Agerer JK 340
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Ammertal,
30.7.77 (Herb. JK 340)

Flagelloscypha pilatii Agerer JK 354
Deutschland, Baden-Württemberg, Rammert,
Bodelshausen, 7.8.77 (Herb. JK 354)

Halocyphina villosa J. & E. Kohlmeyer JK 573
Kolumbien, Uraba, Turbo, Mangrove-Vegetation,
1.7.78, F. OBERWINKLER (Herb. FO 27707)

Henningsomyces puber (Rom. ex Cooke) Reid JK 429
Deutschland, Bayern, Oberjoch, Wildbachtobel,
23.9.77 (Herb. JK 429)

Henningsomyces puber (Rom. ex Cooke) Reid JK 508
Deutschland, Bayern, Oberjoch, Iseler,
25.9.78 (Herb. JK 508)

Lachnella alboviolascens (A. & S. per Pers.: Fr.) Fr. JK 311
Deutschland, Baden-Württemberg, Dettingen, Owen,
1.5.77, H.-O. BARAL (Herb. RA 7661 et JK 311)

Lachnella filicina (Karst.) W.B. Cooke JK 422
Deutschland, Bayern, Oberjoch, Iseler,
22.9.77 (Herb. JK 422)

Lachnella villosa (Pers. per Schw.: Fr.) Gillet JK 396
Österreich, Steiermark, St. Radegund bei Graz,
15.9.77 (Herb. JK 396)

Lachnella spec. JK 541
Kolumbien, Sierra Nevada de Santa Marta, Minca,
21.6.78, F. OBERWINKLER (Herb. FO 27205)

Lachnella spec. JK 542
Kolumbien, Sierra Nevada de Santa Marta, San Torenzo,
16.6.78, F. OBERWINKLER (Herb. FO 26843)

Marasmiellus ramealis (Bull. ex Fr.) Sing. JK 314
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen,
Waldhäuser-Ost, 21.6.77 (Herb. JK 314)

Marasmiellus ramealis (Bull. ex Fr.) Sing. JK 362
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Rammert,
16.8.77 (Herb. JK 362)

Marasmius androsaceus (L. ex Fr.) Fr. JK 346
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Rammert,
31.7.77 (Herb. JK 346)

Marasmius bulliardii Quél. JK 320
Deutschland, Baden-Württemberg, Dußlingen, Rammert, 19.6.77 (Herb. JK 320)

Marasmius cohaerens (Pers. ex Fr.) Fr. TA 77143
Deutschland, Baden-Württemberg, St. Johann, 6.9.77, T. ANKE (Herb. TA 77143)

Marasmius epiphyllus (Pers. ex Fr.) Fr. TA 7744
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Hohenentringen, 19.7.77, T. ANKE (Herb. TA 7744)

Marasmius graminum (Libert) Berk. JK 328
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Rammert, 5.7.77 (Herb. JK 328)

Marasmius oreades (Bolt ex Fr.) Fr. TA 774
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, 27.4.77, T. ANKE (Herb. TA 774)

Marasmius rotula (Scop. ex Fr.) Fr. JK 344
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Pfrondorf, 31.7.77 (Herb. JK 344)

Marasmius scorodonius (Fr.) Fr. TA 7750
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, 31.7.77, T. ANKE (Herb. TA 7750)

Marasmius scorodonius (Fr.) Fr. TA 7960
Deutschland, Baden-Württemberg, Dußlingen, 11.8.79, T. ANKE (Herb. TA 7960)

Micromphale foetidum (Sow. ex Fr.) Sing. JK 315
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Waldhäuser-Ost, 21.6.77 (Herb. JK 315)

Micromphale perforans (Hofm. & Fr.) Sing. TA 7630
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen 5.10.76, T. ANKE (Herb. TA 7630)

Pellidiscus pallidus (Berk. & Br.) Donk JK 415
Deutschland, Bayern, Oberjoch, 21.9.77 (Herb. JK 415)

Pleurotellus chioneus (Pers. ex Fr.) Kühn. JK 571
Deutschland, Bayern, Oberjoch, Wildbachtobel, 14.9.79 (Herb. JK 571)

Pleurotellus chioneus (Pers. ex Fr.) Kühn. TA 7968
Deutschland, Baden-Württemberg, Dußlingen, Rammert, 19.8.79, T. ANKE (Herb. TA 7968)

Pleurotellus hypnophilus (Berk.) Sacc. FO 24375
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, 16.11.76, H.-O. BARAL (Herb. FO 24375)

Pleurotellus hypnophilus (Berk.) Sacc. JK 539
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Schönbuch, 12.12.78, H.-O. BARAL (Herb. JK 539)

Rectipilus fasciculatus (Pers.) Agerer JK 494
Deutschland, Bayern, Oberjoch, Wildbachtobel, 11.9.78 (Herb. JK 494 et RA 8231)

Woldmaria crocea (Karst.) W.B. Cooke JK 351
Deutschland, Baden-Württemberg, Tübingen, Bot. Garten, 2.8.77, F. OBERWINKLER (Herb. FO 24703)

Woldmaria crocea (Karst.) W.B. Cooke JK 462
Norwegen, Sogndal, 27.6.78 (Herb. JK 462)

2.3.2. Teststämme

Bakterien:

Alle Bakterien wurden auf Nährmedium 4 aufbewahrt und für die Versuche in Nährmedium 5 bei den angegebenen Temperaturen inkubiert.

Aerobacter aerogenes Hormaeche et Edwards	37° C
Arthrobacter citreus Sacks - ATCC 11624	27° C
Bacillus brevis Migula - ATCC 9999	37° C
Bacillus subtilis Cohn - ATCC 6633	37° C
Corynebacterium insidiosum (McCulloch) Jensen - ATCC 10253	27° C
Escherichia coli K 12 (Migula) Castellani et Chalmers	37° C
Micrococcus roseus Flügge - ATCC 178	27° C
Mycobacterium phlei Lehmann & Neumann	37° C
Proteus vulgaris Hausser	37° C
Pseudomonas fluorescens Migula - ATCC 13525	27° C
Sarcina lutea Schroeter - ATCC 381	27° C
Staphylococcus aureus Rosenbach - TÜ 202	37° C
Streptomyces PRL 1642	37° C
Streptomyces ATCC 23836	37° C

Pilze:

Alle Pilze wurden in Nährmedium 1 bei 27° C inkubiert.

Ascochyta pisi Lib. - CBS 126.54
Botrytis cinerea Pers. ex Fr. - TÜ 157

Candida albicans (Robin) Berkhout - TÜ 164
Ceratocystis fimbriata Ellis & Halst. - CBS 152.62
Eremothecium ashbyi Guilliermond - TÜ 173
Mucor hiemalis Wehmer
Nadsonia fulvescens (Nadson et Konokotine) Sydow - TÜ 561
Nematospora coryli Peglion - ATCC 10647
Penicillium notatum Westling
Pythium debaryanum Hesse - CBS 265.38
Phytophthora infestans (Mont.) de Bary - CBS 366.51
Pleospora herbarum (Pers. ex Fr.) Rabenh. - CBS 714.68
Rhizoctonia solani Kühn st. bas. *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk - CBS 200.25
Rhodotorula glutinis (Fres.) Harrison var. *dairenensis* Hasegawa et Banno - ATCC 26086
Saccharomyces cerevisiae αS 288c Hansen - TÜ 125
Saccharomyces cerevisiae FL 200 Hansen - Prof. Lacroute, Straßburg
Saccharomyces cerevisiae is 1 Hansen - Prof. Lacroute, Straßburg
Sclerotinia fructigena Aderh. & Ruhl - CBS 496.50

2.4. METHODEN ZUR HERSTELLUNG DER ANTIBIOTIKA

2.4.1. Inkulturnahme der Stämme

Die Stämme wurden fast ausschließlich aus Sporenabdrücken auf Nährmedium 1 oder 3 - vgl. 2.2. - in Kultur gebracht. FO 24375, JK 322 und JK 370 wurden aus steril entnommenen Fruchtkörperstücken isoliert. Die Aufbewahrung der Stämme erfolgte mit Ausnahme von JK 573 bei 4° C in Schrägagarröhrchen auf Medium 1.

2.4.2. Fermentation

Die Anzucht der Stämme für das Screening erfolgte in mit 150 ml Nährmedium 1 oder 2 gefüllten Erlenmeyerkolben mit einer Schikane, die auf der Rotations-Schüttelmaschine 4 Wochen bei 22° C

inkubiert wurden. Jeden zweiten Tag wurde eine Probe entnommen und die antibiotische Aktivität des Kulturfiltrats mit Hilfe des Agardiffusionstests - vgl. 2.6.1. - überprüft.

Für die Herstellung der Antibiotika wurde ein New Brunswick-Fermenter mit 10 l Nutzinhalt (New Brunswick Scientific Co., Modell FS 314) oder ein Biolafitte Fermenter (Biolafitte, Maisons-Laffitte) mit 20 l Nutzinhalt verwendet. 300 bis 900 ml gut gewachsener Vorkulturen in Erlenmeyerkolben dienten jeweils als Inoculum des Fermentationsmediums, dem zur Vermeidung der Schaumentwicklung vor dem Autoklavieren etwa 1 ml Polyol zugesetzt worden war. Die Inkubation in beiden Fermentertypen erfolgte bei 22° C und 120 rpm, wobei 3 - 5 l Luft pro Minute eingeleitet wurden. Der Zeitpunkt des Produktionsmaximums wurde mit Hilfe des Agardiffusionstests bestimmt, als zusätzliche Kontrolle diente die Messung der Glucose-Konzentration des Mediums, die mit Glucotest-Teststreifen ermittelt wurde.

2.4.3. Isolierung und Reinigung der Antibiotika

Nach Erreichen des Produktionsmaximums, je nach Stamm unterschiedlich nach 6 bis 21 Tagen, wurde das Mycel über Rundfilter abgetrennt und das jeweils mehr als 90 % der biologischen Aktivität enthaltende Kulturfiltrat mit Essigester (2,5 bzw. 5 l) extrahiert. Der Essigester-Extrakt wurde über Na_2SO_4 getrocknet und anschließend eingeengt.

Die Reinigung der so erhaltenen Rohprodukte geschah durch Chromatographie an Kieselgel. Zunächst wurde mit $CHCl_3$-Äthanol 99:1 eluiert, die aktiven Fraktionen vereinigt und eingeengt und erneut mit äthanolfreiem $CHCl_3$ (über Al_2O_3 getrocknet) an Kieselgel chromatographiert. In einem anschließenden Reinigungsschritt wurden durch Chromatographie an Sephadex LH-20 letzte Verunreinigungen abgetrennt. An einer 2,5 x 160 cm langen Sephadex LH-20 Säule konnten die drei Substanzen aus *Pleurotellus hypnophilus* entsprechend ihrer Molekülgröße voneinander getrennt werden. Als Elutionsmittel diente jeweils Methanol.

Mit Hilfe dieser Verfahren konnten alle Antibiotika dünnschichtchromatographisch rein erhalten werden. Die kristallinen Substanzen wurden zusätzlich noch aus geeigneten Lösungsmitteln - vgl. 3.3. - umkristallisiert.

2.5. METHODEN ZUR CHEMISCH-PHYSIKALISCHEN CHARAKTERISIERUNG

Dünnschicht-Chromatographie:

Für die Dünnschicht-Chromatographie wurden DC-Alufolien mit Kieselgel 60, F_{254}, Merck 5554, verwendet.
Die Substanzen wurden in folgenden Laufmittelsystemen chromatographiert:

1	Benzol - Aceton - Essigsäure	70 : 30 : 1
2	Cyclohexan - Essigester - Ameisensäure	120 : 40 : 5
3	Chloroform	
4	$CHCl_3$ - Diäthylamin	99 : 1
5	$CHCl_3$ - Salzsäure	99 : 1

Die Lokalisierung der Substanzen erfolgte durch

a) Fluoreszenzlöschung bei 254 nm
b) Entfärbung von $KMnO_4$
c) Anfärbung durch H_2SO_4 + 1 % Vanillin (ZWEIG et al., 1972)
d) Bioautographie, abgewandelt nach KIRST (1971)

Spektren:

Die UV-Spektren in verschiedenen Lösungsmitteln wurden mit einem Zeiss Spektralphotometer PMQ III aufgenommen, die IR-Spektren mit Hilfe eines Perkin-Elmer Spektrograph, Modell 137, angefertigt.

2.6. METHODEN ZUR BIOLOGISCHEN CHARAKTERISIERUNG

2.6.1. Agardiffusionstest

Der Agardiffusionstest (KAVANAGH, 1963) diente generell dem Nachweis antibiotischer Aktivität während des Screenings und der Aufarbeitung. Sporensuspensionen der Testorganismen wurden wie bei WOLF (1971) beschrieben hergestellt. Die Bakterien-Testplatten wurden zweischichtig gegossen, mit etwa 10^6 Bakteriensporen in der Oberschicht, die Pilz-Testplatten einschichtig unter Verwendung von 15 ml Nährmedium 1 oder 8. Die Zugabe der Pilz-Teststämme erfolgte jeweils kurz vor dem Erkalten des Mediums in Form von Sporen-, Sproßmycel- oder Hyphenmycel-Suspensionen.

2.6.2. Wachstumskurve von Pythium debaryanum und Rhizoctonia solani

Das Antibiotikum wurde in verschiedenen Konzentrationen zu je 10 ml Nährmedium gegeben und in sterile Petrischalen gegossen. Als Inoculum diente ein 5 mm großes Agarstückchen mit dem jeweiligen Pilz, welches in der Mitte der Testplatte gesetzt wurde. In Abständen von jeweils 24 Stunden wurde der Durchmesser der wachsenden Kolonie ausgemessen.

2.6.3. Reihenverdünnungstest

Zur Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration diente der Reihenverdünnungstest (KAVANAGH, 1963). Die Teströhrchen wurden leer autoklaviert, die Antibiotika in maximal 5 µl Lösungsmittel steril hineinpipettiert und anschließend mit 1 ml einer auf 10^6 Keime/ml verdünnten Übernachtkultur des jeweiligen Teststamms in Medium 5 oder 1 angeimpft. Die Auswertung erfolgte nach 24 und 48 Stunden.

2.6.4. Einbau von radioaktiv markierten Vorstufen

2.6.4.1. Ehrlich Ascites Carcinom

Mäuse, die 4 Tage zuvor mit Ehrlich Ascites Zellen angeimpft worden waren, wurden uns freundlicherweise von Dr. H.G. Probst, Institut für Physiologische Chemie, Tübingen, überlassen. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich der Tumor in der Phase logarithmischen Wachstums.

Die Entnahme der Ascitesflüssigkeit geschah wie bei PROBST (1973) beschrieben. Als Inkubationsmedium fand der Phosphatpuffer nach MARTIN et al. (1961) Verwendung, der heparinisiert (0,1 mg/ml ≙ 8,5 units) und zusätzlich mit 0,1 mg/ml Glucose versehen wurde.

Die Versuchsanordnung für den Einbau von Vorstufen der Protein-, DNA- und RNA-Synthese entsprach einer etwas modifizierten Vorschrift von WEITZEL et al. (1967). Jeweils 10 ml der auf 1 - 1,5 x 10^6 Zellen/ml verdünnten Zellsuspension wurden in Erlenmeyerkölbchen mit verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen bei 37° C und 130 rpm auf dem Wasserbad 10 Minuten vorinkubiert. Anschließend wurden je 3 ml der vorinkubierten Zellen zu je 0,1 µCi (1-^{14}C)-L-Leucin, 0,1 µCi (2-^{14}C)-Thymidin und 0,1 µCi (2-^{14}C)-Uridin pipettiert und bei 37° C und gelegentlichem Schütteln weitere 20 Minuten inkubiert. Nach Versuchsende wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment in 3 ml 5 % TCA resuspendiert und gefällt. Der säureunlösliche Niederschlag wurde auf Nitrozellulose-Filtern (Porengröße 0,45 µm, Ø 23 mm; Selektron B 1785) gesammelt und mit 10 ml 5 % TCA nachgewaschen. Die Radioaktivitätsmessung der getrockneten Filter (60° C, 1 Stunde) erfolgte in 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Quickszint 501) mit einem Flüssigkeits-Szintillations-Spektrometer (Betascint BF 5000, Fa. B. Friesecke).

2.6.4.2. *Bacillus brevis* und *subtilis*

Eine 150 ml-Vorkultur von *Bacillus brevis* oder *Bacillus subtilis* wurde in doppelt konzentriertem Nährmedium 4 auf der Wasserbad-Schüttelmaschine bei 37° C und 160 rpm bis zu einer OD von 0,9 angezogen. Je 10 ml der Vorkultur wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Antibiotika unter den gleichen Bedingungen 10 Minuten vorinkubiert. Der Einbau der radioaktiv markierten Vorstufen erfolgte in kleinen Erlenmeyerkölbchen (37° C, 300 rpm) mit jeweils 3 ml der vorbehandelten Zellen sowie je 0,2 µCi der Vorstufen (1-^{14}C)-L-Leucin, (2-^{14}C)-Uracil und (2-^{14}C)-Thymidin. Nach 15 Minuten wurden jedem Kölbchen 0,5 ml entnommen und in 2 ml kalter 10 % TCA gefällt. Die Weiterbehandlung des TCA-Niederschlags geschah wie unter 2.6.4.

2.6.5. Aufnahme von radioaktiv markierten Vorstufen

2.6.5.1. Ehrlich Ascites Carcinom

Die in die Zellen nach Vorbehandlung durch die Antibiotika inkorporierte Gesamtradioaktivität verschiedener Vorstufen wurde folgendermaßen bestimmt:

In der ersten Versuchsanordnung wurde die Aufnahme markierten Uridins, Glucose und α-Aminoisobuttersäure in glucosefreiem Phosphatpuffer - vgl. 2.6.4.1. - getestet. Die Ehrlich Ascites Zellsuspension wurde - wie unter 2.6.4.1. beschrieben - 10 Minuten mit verschiedenen Antibiotika-Konzentrationen vorinkubiert, jeweils 2 ml zu 0,1 µCi (2-^{14}C)-Uridin, 0,1 µCi ^{14}C-Glucose (+ 0,5 µg unmarkierte Glucose) oder 0,2 µCi (1-^{14}C)-AIB pipettiert und 10 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit je 2 ml 1 % Uridin-, Glucose oder Glycin-Lösung gewaschen, erneut zentrifugiert und das Zellsediment direkt zu 5 ml Scintillationsflüssigkeit gegeben (Quickszint 294). Als Kontrollwert dienten bei 0° C inkubierte Ansätze.

In einem zweiten Versuch wurde die Aufnahme verschiedener Vorstufen der Nucleinsäuresynthesen untersucht. Die Zellen wurden

- in glucosehaltigem Phosphatpuffer - wiederum 10 Minuten vorinkubiert, je 1 ml in Eppendorf-Cups zu 0,1 µCi der ^{14}C-markierten oder 0,2 µCi der ^{3}H-markierten Vorstufen gegeben und 5 Minuten bei 37° C inkubiert. Abgesehen vom Waschen mit Phosphatpuffer erfolgte die Weiterbehandlung wie oben beschrieben.

2.6.5.2. *Bacillus brevis*

Jeweils 10 ml einer exponentiell wachsenden *Bacillus brevis*-Kultur (OD = 1,1; doppelt konzentriertes Medium 4) wurden mit oder ohne Antibiotikum 5 Minuten vorinkubiert. Der Start erfolgte durch Zugabe von je 0,2 µCi (2-^{14}C)-Uridin. Nach 1 Minute und in der Folge alle 2 Minuten wurde ein Aliquot von 0,5 ml entnommen, auf einen mit 0,05 % eiskalter Uridin-Lösung vorgetränkten Membranfilter gegeben und mit 5 ml der Uridin-Lösung nachgewaschen. Um den TCA-unlöslichen Anteil des in die Zellen inkorporierten Uridins zu bestimmen, wurde zu den angegebenen Zeiten jeweils auch noch ein 0,5 ml Aliquot in 2 ml 5 % TCA gefällt.

2.6.6. Einbau und Aufnahme radioaktiv markierter Vorstufen in Hühnerembryo-Fibroblasten*

Die Präparation und Kultur der Hühnerembryo-Fibroblasten erfolgte weitgehend in Anlehnung an VOGT (1969) und HUNTER (1979).

Das Medium für Primärkulturen setzte sich wie folgt zusammen: Medium 199 (verdünnt nach Vorschrift), 20 mM $NaHCO_3$, 0,3 % Tryptose phosphate broth, 7,5 % Kalbsserum, 1,7 % Hühnerserum; 1 x 10^{4} U Penicillin G und 5 mg Streptomycin auf 100 ml Medium.

Sekundärkulturen wurden in folgendem Medium angezogen: Scherers Medium (verdünnt nach Vorschrift), 20 mM $NaHCO_3$, 0,3 % Tryptose phosphate broth, 5 % Kalbsserum, 0,1 % Rinderembryo-Extrakt,

---

* Alle Versuche an Hühnerembryo-Fibroblasten wurden im Labor von Dr. F. Lipmann, The Rockefeller University, New York, durchgeführt. Die angebrüteten Hühnereier sowie der Rous-Sarcoma-Virus tsNY68 stammten von Dr. H. Hanafusa, The Rockefeller University, New York.

Antibiotika wie bei Primärkulturen.

Fibroblasten wurden wie bei VOGT (1969) beschrieben aus 10 Tage alten Hühnerembryonen durch Trypsinisierung (0,25 % Trypsin-Lösung) isoliert und als Primärkulturen in mit Trockeneis begasten Roller-Flaschen (Bellco, Smith-Kozuan, New Jersey) 3 Tage kultiviert. Die confluenten Fibroblasten wurden erneut trysinisiert und als Sekundärkulturen mit einer Animpfdichte von 1 - 1,2 x 10^6 Zellen/Platte in 60 mm Kultur-Petrischalen überimpft. Diese wurden in einem CO_2-Inkubator (5 % CO_2, mit Luftbefeuchtung; Wedco, Silver Spring) bei 36° C bis zum Erreichen des gerade confluenten Stadiums angezogen (2 - 3 Tage).

Um transformierte Zellen zu erhalten, wurden zum Zeitpunkt des Anwachsens direkt Primärkulturen mit der temperatursensitiven Mutante tsNY68 des Rous-Sarcoma-Virus infiziert, die Sekundärkulturen bei 41° C angezogen und 12 - 18 Stunden vor Beginn der Experimente zur morphologischen Ausprägung des transformierten Zustands ebenfalls nach 36° C überführt.

Alle Versuche an den subconfluenten oder gerade confluenten Fibroblasten-Kulturen wurden in Hanks-Puffer + 0,1 % Glucose (BASHOR, 1979) durchgeführt.

Für die Einbau-Experimente wurde das Medium entfernt, die Zellschicht einmal mit Hanks-Puffer gewaschen und in 5 ml Puffer mit oder ohne Antibiotika 30 Minuten bei 36° C vorinkubiert. Anschließend wurde je 1 µCi (Methyl-^{3}H)-Thymidin, 1 µCi (4,5-^{3}H)-L-Leucin bzw. 2 µCi (5,6-^{3}H)-Uridin zugegeben und weitere 60 Minuten inkubiert. Das Stoppen der Reaktion erfolgte nach Entfernen des Inkubationspuffers und einmaligem Waschen durch Zugabe von 5 ml 5 % TCA. Nach 15 Minuten wurde der TCA-Überstand ebenfalls entfernt, nochmals gewaschen, die Zellschicht in 3 ml 0,1 n NaOH aufgenommen und ein Aliquot von 0,5 ml nach Neutralisieren in 10 ml Scintillationsflüssigkeit (Aquasol) gezählt.

Die Messung der Aufnahme entsprechender Vorstufen in die Zellen erfolgte in ähnlicher Weise, indem lediglich 20 Minuten inkubiert und anschließend die Zellschicht nach zweimaligem Waschen direkt in 3 ml 0,1 n NaOH gelöst wurde.

2.6.7. Bestimmung der säure-löslichen Uridin-Nucleotide in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms

6×10^6 Ehrlich Ascites Zellen/ml wurden wie zuvor beschrieben - vgl. 2.6.4.1. - mit 10 µg/ml Crinipellin oder ohne Antibiotikum 10 Minuten vorinkubiert. Je 1 ml wurde in Eppendorf-Cups zu je 0,5 µCi (2-^{14}C)-Uridin pipettiert und 2 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Zellen wurden sofort abzentrifugiert, einmal mit Phosphatpuffer gewaschen, erneut zentrifugiert, der Überstand sorgfältig entfernt und das Zellsediment in 20 µl 2 % Ameisensäure aufgenommen.

Nach einstündiger Einwirkungszeit wurden 5 µl des Säureüberstands auf Polyäthylenimin-imprägnierte Platten (Polygram, CEL 300 PEI, Macherey & Nagel) aufgetragen und zusammen mit nichtmarkiertem Uridin, UMP, UDP und UTP als Carrier in folgendem Laufmittelsystem chromatographiert:

0,4 M LiCl - 0,25 M Ammoniumformiat, pH 4,2.

Die entwickelten Dünnschichtplatten wurden mit dem Radiochromatogramm-Scanner (Dünnschicht-Scanner, Berthold) ausgewertet.

2.6.8. RNA-Synthese mit isolierten Zellkernen des Ehrlich Ascites Carcinoms

Die Isolierung erfolgte zunächst (Crinipellin und Scorodonin, vgl. 3.6.4.2.) nach PROBST (1973), in der Folge mit einer verkürzten Methode in Anlehnung an MURAMATSU et al. (1974).

Die Ehrlich Ascites Zellen aus 2 Mäusen wurden zunächst in 10 ml eines hypotonischen Puffers (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$) 10 Minuten bei 0° C vorgequollen, 5 Minuten bei 600 x g abzentrifugiert und anschließend in 5 ml des Puffers unter Detergenzzusatz (1 % Brij 58) in einem Glashomogenisator (Braun, Melsungen) aufgeschlossen. Mit dem schwergängigen Teflon-Stempel wurde die Zellsuspension fünf- bis sechsmal homogenisiert, wobei der Grad des Zell-Aufschlusses jeweils unter dem Phasenkontrast-Mikroskop beurteilt wurde. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation bei 1500 x g (5 Minuten)

sedimentiert, das Sediment in Glycerin-Puffer suspendiert, erneut zentrifugiert und schließlich in 1 ml Glycerin-Puffer bei 0^{o} C aufbewahrt.

Der Glycerin-Puffer setzte sich wie folgt zusammen:

50	mM	Tris-HCl, pH 7,4
7,5	mM	$Mg(OAc)_2$
5	mM	DTE
0,1	mM	EDTA
25	%	Glycerin

Der Reaktionsansatz entsprach der von BLUHM (1974) angegebenen Zusammensetzung:

30	mM	Tris-HCl, pH 8
250	mM	Saccharose
0,33	mM	ATP, GTP, CTP je
1	mM	EDTA
0,1	mM	DTE
130	mM	Ammoniumsulfat
3	mM	$MnCl_2$
1	mM	$MgCl_2$
0,5	µCi	(5-^{3}H)-UTP/Ansatz

50 µl der Kernsuspension wurden zu jeweils 200 µl des Inkubationsansatzes mit oder ohne Antibiotikum gegeben und die Reaktion sofort durch Inkubation bei 37^{o} C und 300 rpm auf der Wasserbad-Schüttelmaschine gestartet. Nach 30 Minuten wurde jeweils 2 ml eiskalter 5 % TCA zugegeben und der säureunlösliche Niederschlag auf Membranfiltern gesammelt.

2.6.9. DNA-Synthese mit Toluol-behandelten Zellen von *Bacillus brevis*

Exponentiell wachsende Zellen von *Bacillus brevis* (OD = 0,7) wurden nach der von MOSES und RICHARDSON für *Escherichia coli* (1970) angegebenen Methode toluolisiert, in 0,05 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5 in einer Zelldichte von 10^{9} Zellen/ml aufgenommen und sofort im Test eingesetzt.

Der Reaktionsansatz, von NÜSSLEIN und KLEIN (1975) für die Zellophanmembran-Methode mit *Escherichia coli* entwickelt, setzte sich wie folgt zusammen:

20	mM	Tris-HCl, pH 7,8
5	mM	$MgCl_2$
0,1	mM	EDTA
100	mM	KCl
1	mM	ATP
0,2	mM	NAD
0,02	mM	dATP, dTTP, dCTP, dGTP je
1	µCi	(Methyl-^{3}H)-dTTP/Ansatz

20 µl der vorbehandelten Bakterien-Suspension wurden zu je 100 µl des Testansatzes mit oder ohne Antibiotikum gegeben, 5 Minuten bei 37° C vorinkubiert und dann je 1 µCi dTTP hinzupipettiert. Nach 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 ml kalter 10 % TCA mit 1 % Natrium-pyrophosphat gestoppt und die säureunlösliche Radioaktivität auf Membranfiltern gesammelt.

2.6.10. Sauerstoffaufnahme und oxidative Phosphorylierung in Rattenlebermitochondrien

Mitochondrien aus Rattenleber wurden nach der Vorschrift von JOHNSON und LARDY (1967) unter Verwendung eines Glashomogenisators mit leichtgängigem Telfon-Stempel isoliert.

Die Messung der Sauerstoffaufnahme und der oxidativen Phosphorylierung erfolgte in einem kleinen, luftdicht abgeschließenden Reaktionsgefäß polarographisch mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (Clark-Elektrode, Bachhofer, Reutlingen).

Zu 2,7 ml Medium der Zusammensetzung:

0,1	M	NaCl
6	mM	$MgCl_2$
10	mM	Tris-HCl, pH 7,4
20	mM	Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,4

wurden 300 µl Mitochondrien-Suspension gegeben und der Atmungszustand 4 mit α-Ketoglutarat eingestellt. Atmungskontrollkoeffizient und P/O-Verhältnis wurden nach ESTABROOK (1967) und LESSLER (1969) berechnet.

2.6.11. Mutagenität im Ames-Test

Im "Ames-Test" werden die unter Einfluß einer Substanz gehäuft auftretenden Revertanten aus Histidin-auxotrophen *Salmonella typhimurium*-Stämmen als Indiz auf carcinogene Eigenschaften gewertet (AMES et al., 1975).

Die Antibiotika wurden gegen die Stämme TA 98, TA 100, TA 1535 und TA 1538 getestet, deren Eigenschaften bei AMES et al. (1975) beschrieben sind.

Die Herstellung der Testplatten entsprach den Vorschriften von AMES et al. (1975), die Unterschicht wurde mit Nährmedium 6 zubereitet, den 2 ml Oberschicht - Nährmedium 7 - wurde unmittelbar vor dem Gießen 200 µl einer Übernacht-Kultur des entsprechenden Teststamms hinzugefügt. Antibiotika-haltige Filterrondellen wurden auf die Oberschicht gelegt, die Platten bei 37° C inkubiert und nach 2 Tagen die Anzahl der Revertanten in einem Ring um die Filterrondelle ausgezählt.

2.6.12. Biomimetische Versuche mit Cystein

Die Inaktivierung einiger Antibiotika durch Thiole wurde in einem Modellversuch überprüft. In Anlehnung an die Versuche von KUPCHAN et al. (1970) wurden die Antibiotika zu 100 µl einer 10 mM bzw. 30 mM-L-Cystein-Lösung in Phosphatpuffer, pH 7,4, gegeben. Zu den im Ergebnisteil angegebenen Zeiten - vgl. 3.7.4.2. - wurde ein Aliquot entnommen, auf eine Filterrondelle pipettiert und im Agardiffusionstest gegen *Bacillus brevis* getestet. Als Kontrollen dienten gleichbehandelte Ansätze in Phosphatpuffer ohne Cystein.

2.6.13. Test der Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe in vitro

Als Inkubationspuffer wurde ein 75 mM Pyrophosphat - 75 mM Semicarbazid-Puffer, pH 8,6 verwendet, durch den die Enzymreaktion in Richtung Acetaldehyd und NADH + H^+ als Endprodukte verschoben wird.

15 µg des Enzyms (Alkohol : NAD Oxidoreduktase E.C. 1.1.1.1.) wurden mit oder ohne Antibiotikum in 2 ml Puffer 5 Minuten bei 0° C vorinkubiert, die Reaktion durch Hinzufügen von 1 µmol NAD und 0,3 mmol Äthanol gestartet und die Bildung von NADH + H^+ photometrisch bei 340 nm mit angeschlossenem Schreiber verfolgt. In weiteren Versuchen wurde das Enzym vor der Antibiotika-Inkubation mit jeweils dem Coenzym oder dem Substrat 5 Minuten vorinkubiert.

2.6.14. Hämolyse-Test

Die Prüfung auf Freisetzung von Hämoglobin aus heparinisiertem (100 I.E./ml) Rinderblut erfolgte nach der Hämiglobincyanidmethode (MERCK, 1974). Die Versuchsanordnung entsprach der bei QUACK (1978) beschriebenen.

2.6.15. Phytotoxizitäts-Versuche

Die Versuche zur Hemmung des Längenwachstums von *Avena*-Koleoptil- bzw. *Helianthus annuus*-Hypocotyl-Segmenten wurden wie bei SPRING (1980) beschrieben durchgeführt.

Als Inkubationspuffer diente die Robin'sche Nährlösung der Zusammensetzung:

0,8 mM KNO_3
0,7 mM $MgSO_4$
0,6 mM KCl
5 µM $FeCl_3$
pH 6 mit Phosphatpuffer eingestellt

Beiden Tests liegt die Hemmwirkung der Antibiotika auf die Indolessigsäure-induzierbare Längenzunahme der Segmente zugrunde. Von *Avena*-Koleoptilen wurden 10 mm Segmente mit oder ohne IES sowie verschiedenen Konzentrationen der Antibiotika 4 Stunden inkubiert und anschließend die Segmente ausgemessen. Mit Wegaufnehmer-Versuchen wurde der zeitliche Wachstumsverlauf der *Helianthus*-Hypocotyl-Segmente verfolgt.

2.6.16. RNA-Synthese mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* in vitro

Der Versuch wurde nach der Vorschrift von FUCHS et al. (1967) durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1. SCREENING UND AUSWAHL DER PRODUZENTENSTÄMME

Kulturen aller unter 2.3.1. aufgeführten Stämme wurden in Nährmedium 1 und zum Teil Nährmedium 2 auf die Bildung antibakterieller oder antifungischer Substanzen in Submerskultur untersucht. Als Testorganismen dienten *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, *Penicillium notatum* und *Eremothecium ashbyi*.

In der vorangegangenen Arbeit (KUPKA, 1978) konnte aus dem Stamm *Crinipellis stipitaria* TA 7612 das Antibiotikum Crinipellin (K-7612) isoliert werden, das auch in allen anderen *Crinipellis stipitaria*-Stämmen nachgewiesen wurde. Physikalisch-chemische sowie biologische Eigenschaften des Diterpens sind bei KUPKA (1978) und KUPKA et al. (1979) zusammengestellt. Die weiterführenden Untersuchungen dieser Substanz folgen in Kapitel 3.6. und 3.7.1.

Von den getesteten *Marasmius*-, *Marasmiellus*- und *Micromphale*-Stämmen zeigten nur Kulturfiltrate von *Marasmiellus ramealis* und *Marasmius scorodonius* antibiotische Aktivität. Die Substanz aus *Marasmiellus ramealis* konnte UV-spektroskopisch als Marasin identifiziert werden, ein Polyacetylen, das bereits von BENDZ (1959) aus der gleichen Art isoliert wurde.

Aus der Gruppe der cyphelloiden Arten fielen *Cyphellopsis anomala* durch die Produktion eines antifungischen, *Flagelloscypha pilatii*, *Halocyphina villosa* und *Lachnella* spec. JK 541 durch die Bildung antibakterieller und antifungischer Substanzen auf.

Die Pilze hemmende Verbindung aus dem amerikanischen *Cyphellopsis anomala*-Stamm ist identisch mit Strobilurin A - Nachweis UV-spektroskopisch -, einem Antibiotikum mit weitgestreuter Verbreitung innerhalb der *Tricholomataceae* (SCHRAMM et al., 1978; BÄUERLE, 1979).

Kulturfiltrate des einzigen untersuchten agaricalen Braunsporers, *Pleurotellus hypnophilus*, zeigten im Screening eine schwache Wirkung gegen *Bacillus brevis*.

Aufgrund der Screening-Ergebnisse wurden zusätzlich zu *Crinipellis stipitaria* TA 7612 folgende weitere Stämme für die Antibiotikaproduktion im 10- oder 20 l-Fermenter herangezogen:

Flagelloscypha pilatii	JK 322
Lachnella spec.	JK 541
Halocyphina villosa	JK 573
Pleurotellus hypnophilus	FO 24375
Marasmius scorodonius	TA 7750

Standen mehrere Stämme einer Art zur Verfügung, wurde das jeweilige Vorkommen des gleichen Antibiotikums auch in den weiteren Stämmen DC-chromatographisch und UV-spektroskopisch nachgewiesen.

Lachnella spec. JK 541 einer in den zugänglichen Monographien beschriebenen Art zuzuordnen, erwies sich vor allem aufgrund des ungenügenden Bearbeitungsstands mittel- und südamerikanischer Cyphellaceen als sehr problematisch.

Aller Wahrscheinlichkeit handelt es sich um eine neue, noch nicht beschriebene Art (AGERER; Persönliche Mitteilung), deren morphologische Charakteristika im folgenden kurz umrissen werden sollen:

Lachnella spec. (FO 27205) JK 541

Fruchtkörper auf Holz, einzeln oder zu kleinen Gruppen vereint, bis maximal 1 mm breit, sitzend bis kurz gestielt. In getrockneten Exemplaren Fruchtkörpermündung völlig verschlossen und von darüber hinausragenden Randhaaren bedeckt. Fruchtkörper dadurch oftmals fast pinselförmig. Randhaare dextrinoid, bis in das stumpfe Ende von feinen Kristallen besetzt. Nach Zugabe von 10 % KOH Kristalle sich auflösend, die extrem dickwandigen Randhaare stellenweise tonnenförmig anschwellend. Basidien über 50 µm lang, mit bis zu 8 - 10 µm langen, dicken, hornförmig gebogenen Sterigmata. Basidien viersporig. Sporen 12 - 15 µm lang und 4,5 - 6 µm breit, Sporenform "Subfalcispora"-ähnlich (AGERER, 1979).

Die aufgeführte Merkmalskombination ordnet *Lachnella* spec. in die Nähe von *Lachnella tiliae* (Peck) Donk und *Lachnella villosa* (Pers. ex Fr.) Gillet ein.

3.2. FERMENTATION

Im folgenden sind die je nach Stamm unterschiedlichen Fermentationsbedingungen zusammengestellt. Bei allen in Nährmedium 1 kultivierten Produzenten fiel das Maximum der Antibiotika-Produktion mit einem Abfall des Glucose-Gehalts im Medium zusammen.

Flagelloscypha pilatii
Der Stamm wächst bei einer Belüftung von 3 l/min sehr schnell mit flockigem Mycel in Nährmedium 1. Das Maximum der Antibiotika-Produktion wird nach 8 - 10 Tagen erreicht.

Lachnella spec. JK 541
Lachnella spec. bildete bereits nach 5 Tagen in Medium 1 im 20 l-Fermenter die Hauptmenge einer stark wirksamen antibakteriellen und antifungischen Substanz.

Pleurotellus hypnophilus
Das schnallenlose Mycel von *Pleurotellus* wächst im 20 l-Fermenter in Medium 1 bei Belüftungsraten von 2 - 3 l/min in Form von Pellets. Die Konzentration der von dem Stamm gebildeten Antibiotika im Kulturfiltrat ist sehr gering, so daß zur Beurteilung des Fermentationsverlaufs jeweils eine 100 ml Probe durch Essigester-Extraktion um das einhundertfache angereichert werden mußte. Das Maximum der Hemmstoff-Produktion wird nach 14 - 15 Tagen erreicht.

Halocyphina villosa
Halocyphina ist submers nur in Medium 2 kultivierbar, wächst auch in diesem zuckerreichen Medium nur sehr langsam und bildet eine antibiotisch aktive Substanz erst nach 21 Tagen.

Marasmius scorodonius
Der Stamm produziert das Antibiotikum nach 14 Tagen Submerskultur in Medium 1.

3.3. ISOLIERUNG UND REINIGUNG DER ANTIBIOTIKA

Die Isolierung und Reinigung der jeweils in den Kulturfiltraten enthaltenen Antibiotika ist in den folgenden Aufarbeitungsschemata kurz zusammengefaßt. Die Mycelien wurden nicht extrahiert, da sie stets weniger als 10 % der Gesamtaktivität enthielten.

Flagelloscypha pilatii

20 l Kulturfiltrat

| Extraktion mit 5 l Essigester

3 g Rohprodukt

| Kieselgel $CHCl_3$/EtOH 99:1

2,4 g Eluat 1

| Kieselgel $CHCl_3$

1 g Eluat 2

| Sephadex LH-20 Methanol

500 mg K-322

Homogenes Öl, nach einigen Wochen auskristallisierend

Lachnella spec.

20 l Kulturfiltrat

| Extraktion mit
| 5 l Essigester

1,5 g Rohprodukt

| Kieselgel
| $CHCl_3$/EtOH 99:1

500 mg Eluat 1

| Sephadex LH-20
| Methanol

350 mg kristalline Substanz

| umkristallisiert
| aus Methanol

310 mg kristalline Marasminsäure

Pleurotellus hypnophilus

20 l Kulturfiltrat

| Extraktion mit
| 5 l Essigester

2 g Rohprodukt

| Kieselgel
| $CHCl_3$: EtOH 99:1

800 mg Eluat 1

| Kieselgel
| $CHCl_3$

300 mg Eluat 2

| Sephadex LH-20
| Methanol

a) 50 mg K-24375/1 homogenes, farbloses Öl

b) 30 mg K-24375/3 homogenes, farbloses Öl

c) 50 mg K-24375/2 kristallin

| umkristallisiert aus
| Essigester-Petroläther

weiße kurze Nadeln

Halocyphina villosa

10 l Kulturfiltrat

↓ Extraktion mit 2,5 l Essigester

1,3 g Rohprodukt

↓ Kieselgel $CHCl_3$: EtOH 99:1

260 mg kristalline Substanz

↓ umkristallisiert aus MeOH

240 mg kristallines Siccayne

leicht gelbliche Plättchen

Marasmius scorodonius

20 l Kulturfiltrat

↓ Extraktion mit 5 l Essigester

3 g Rohprodukt

↓ Kieselgel $CHCl_3$: EtOH 99:1

400 mg Eluat 1

↓ Sephadex LH-20 Methanol

200 mg Scorodonin, homogenes gelbes Öl

3,4. PHYSIKALISCH-CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG

Die aus den einzelnen Arten isolierten Antibiotika sind im folgenden durch UV- und IR-Spektren sowie gegebenenfalls den Schmelzpunkt charakterisiert. Ihre Rf-Werte sind im Anschluß tabellarisch zusammengestellt.

1. K-322 aus *Flagelloscypha pilatii*

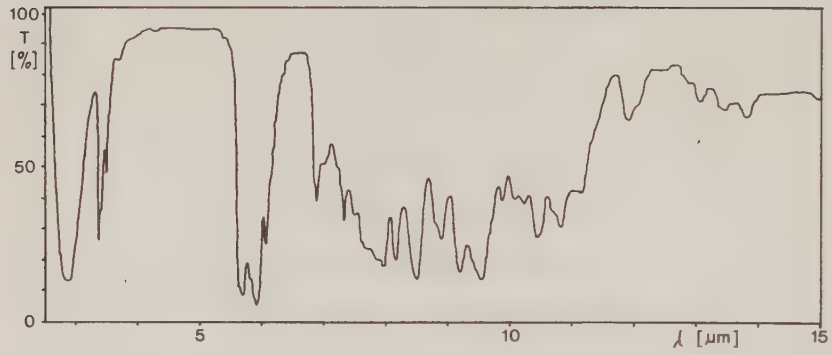


Abb. 1: IR-Spektrum von K-322 in KBr

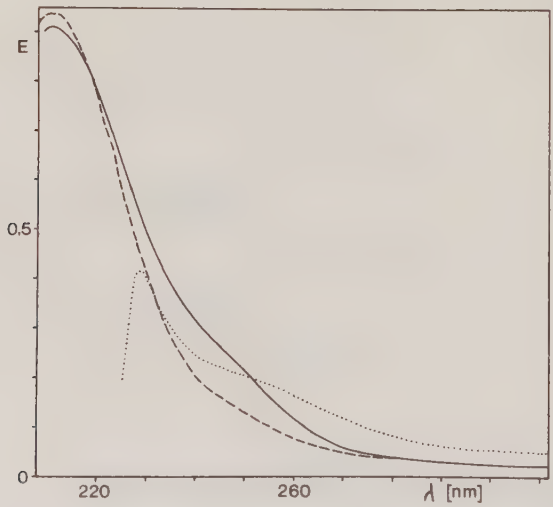


Abb. 2: UV-Spektrum von K-322

———— : in Äthanol
····· : in 0,1 n NaOH in Äthanol
– – – – : in 0,1 n HCl in Äthanol

Das UV-Spektrum von K-322 zeigt nur Endabsorption und eine schwache Schulter bei etwa 250 nm, die in 0,1 n HCl verschwindet.

2. Marasminsäure aus *Lachnella* spec. JK 541

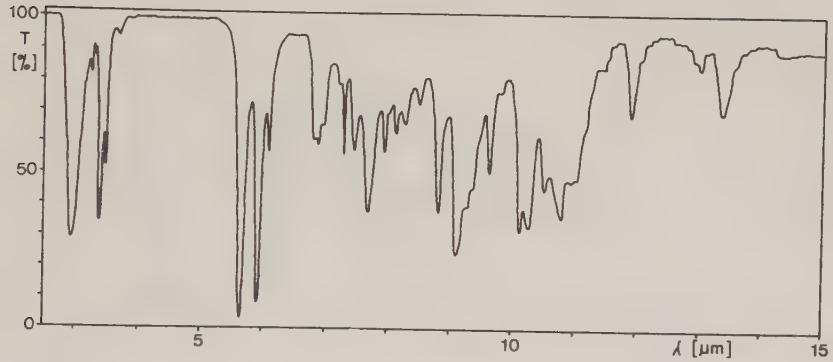


Abb. 3: IR-Spektrum von Marasminsäure in KBr

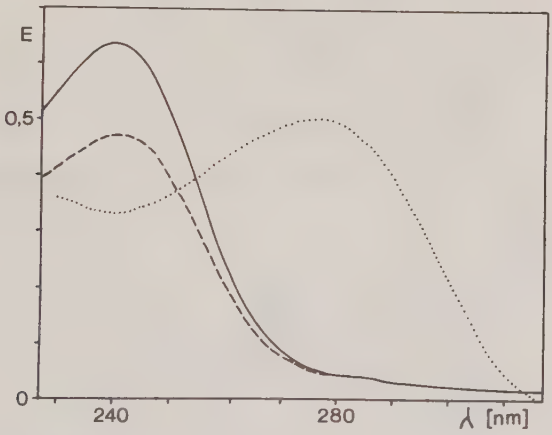


Abb. 4: UV-Spektrum von Marasminsäure

———— : in Äthanol
····· : in 0,1 n NaOH in Äthanol
-------- : in 0,1 n HCl in Äthanol

λ max (log ε): 240 nm (3,97) in Äthanol
270 nm (3,84) in 0,1 n NaOH in Äthanol
240 nm (3,85) in 0,1 n HCl in Äthanol

Schmelzpunkt: 168° C

3. K-24375/1, K-24375/2 und K-24375/3 aus *Pleurotellus hypnophilus*

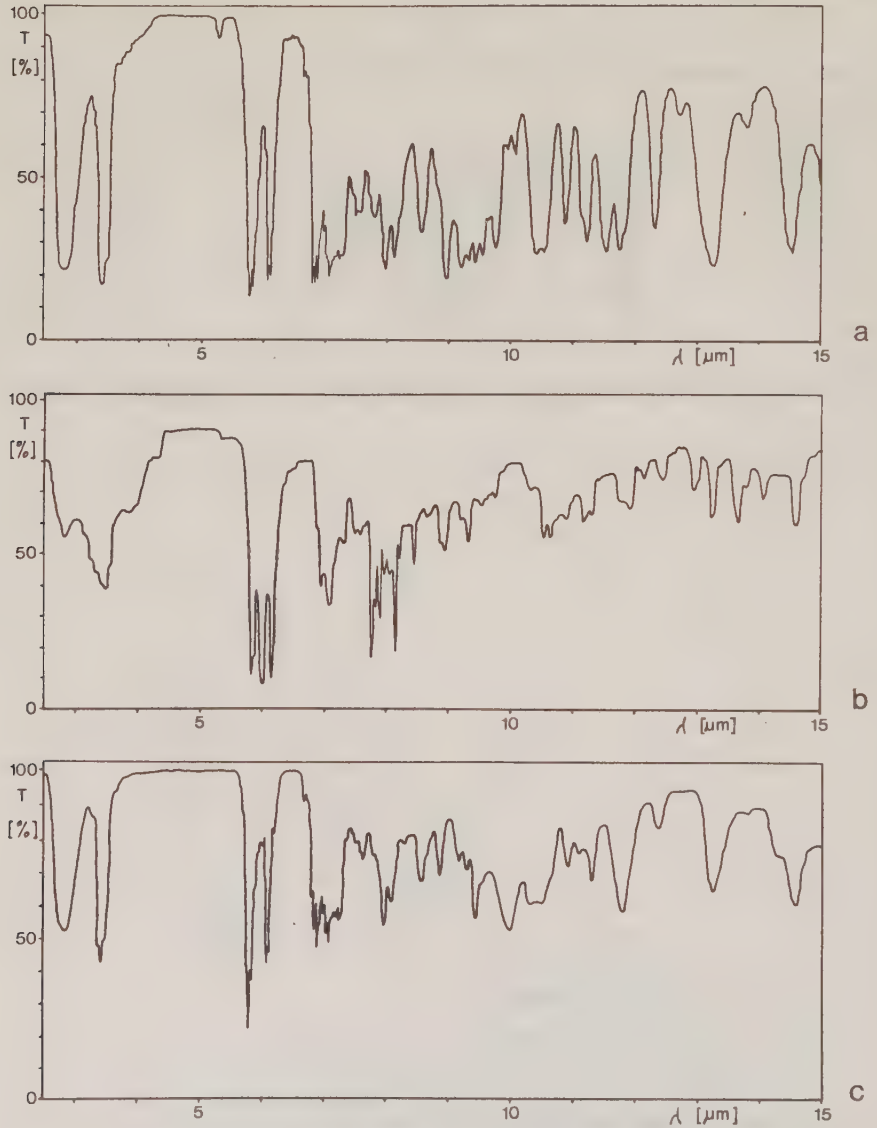
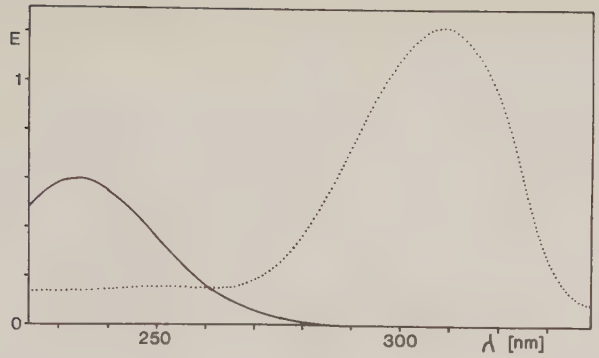
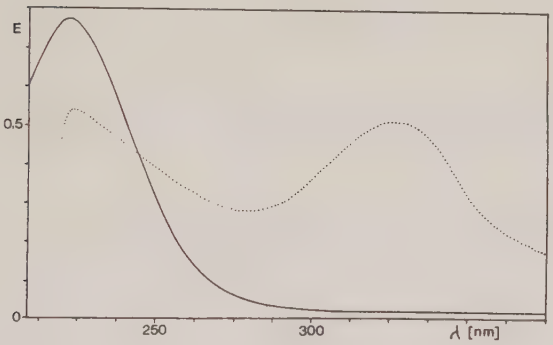


Abb. 5: IR-Spektren der Antibiotika aus *Pleurotellus hypnophilus*

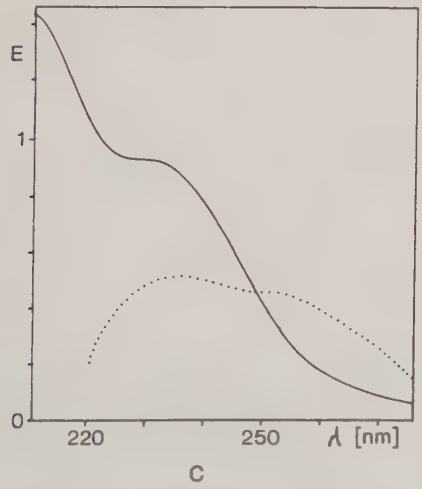
K-24375/1 auf NaCl-Fenster (a)
K-24375/2 in KBr (b)
K-24375/3 auf NaCl-Fenster (c)



a



b



c

Abb. 6: UV-Spektren der Antibiotika aus Pleurotellus

_____ : in Äthanol
..... : in 0,1 n NaOH in Äthanol

K-24375/1 (a)
K-24375/2 (b)
K-24375/3 (c)

	λ max in nm (log ε) in Äthanol	λ max in nm (log ε) in 0,1 n NaOH in Äthanol
K-24375/1	234 (3,90)	308 (4,25)
K-24375/2	226 (4,07)	226 (3,92)
K-24375/3	-	308 (3,90)

4. Siccayne aus *Halocyphina villosa*

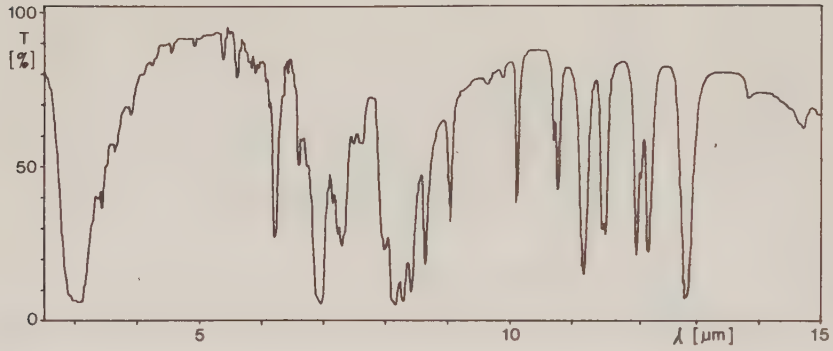


Abb. 7: IR-Spektrum von Siccayne in KBr

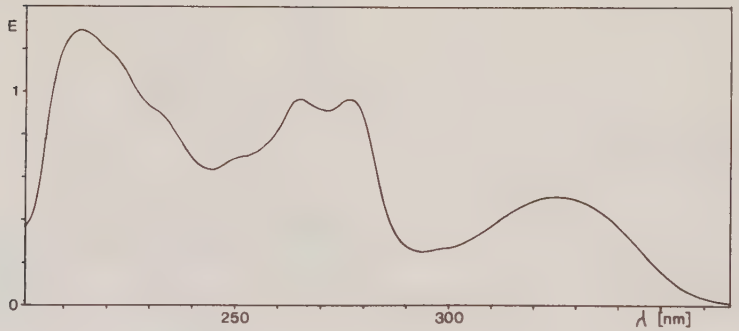


Abb. 8: UV-Spektrum von Siccayne in Äthanol

λ max (nm): 328, 276, 264, 215
Schmelzpunkt: 112° C

5. Scorodonin aus *Marasmius scorodonius*

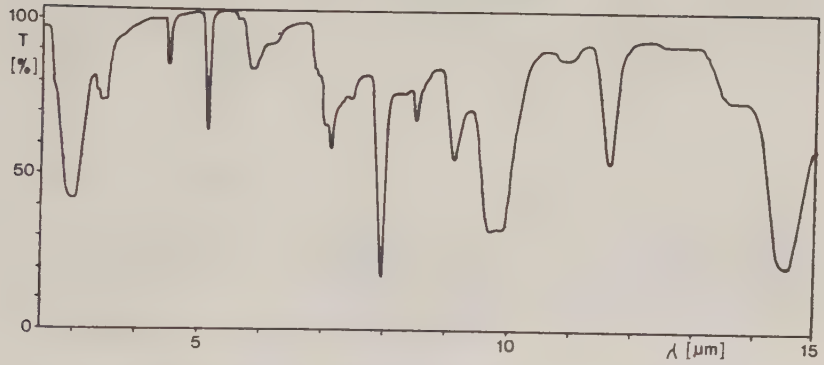


Abb. 9: IR-Spektrum von Scorodonin (NaCl-Fenster)

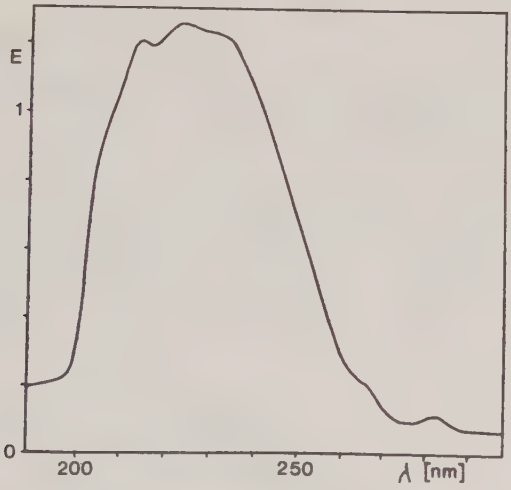


Abb. 10: UV-Spektrum von Scorodonin in Äthanol

log ε = 4,04 (223 nm)

Tabelle 1: Rf-Werte der isolierten Antibiotika

Laufmittel-system*	K-322	Marasmin-säure	K-24375/1	K-24375/2	K-24375/3
1	0,65	0,72	0,8	0,68	0,65
2	0,23	0,24	0,37	0,37	0,28
3	0,08	0,13	0,21	0,08	0,18
4	-	-	0,19	-	0,16
5	0,13	0,16	0,25	0,10	0,21

Laufmittelsystem*	Siccayne	Scorodonin
1	0,77	0,8
2	0,43	0,38
3	0,24	0,3
4	0,18	0,3
5	0,28	0,29

* Zusammensetzung der Laufmittel - vgl. 2.5.

Alle Substanzen können durch Fluoreszenzlöschung bei 254 nm bzw. durch positive Farbreaktion mit einem der genannten Sprühreagentien lokalisiert werden - vgl. 2.5.

Löslichkeit: In organischen Lösungsmitteln wie Aceton, Methanol, Äthanol, Chloroform, Essigester oder Benzol sind alle Substanzen gut löslich, nur partiell in Cyclohexan, Petroläther oder in Wasser.

3.5. DATEN ZUR STRUKTUR DER ANTIBIOTIKA

Alle bisher vorliegenden Strukturen sowie Daten zur Struktur wurden von Professor Dr. W. STEGLICH, Institut für Organische Chemie der Universität Bonn, sowie seinen Mitarbeitern B.M. GIANNETTI, G. SCHRAMM und Dr. L. ZECHLIN ermittelt.

3.5.1. Crinipellin

Bei diesem Antibiotikum handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um ein acetyliertes Diterpen mit einem Molekulargewicht von 372 und der - aus der Hochauflösung des Massenspektrums zu entnehmenden - Bruttozusammensetzung

$$C_{22}H_{28}O_5.$$

Außer dem Acetatrest sind als weitere Partialstrukturen bisher drei tertiäre und eine sekundäre Methylgruppe bekannt.

3.5.2. Marasminsäure

Die von dem Stamm *Lachnella* spec. JK 541 produzierten weißen Kristalle konnten nach Aufnahme von NMR-Spektren sowie Vergleich mit Originalsubstanz als Marasminsäure identifiziert werden.

Marasminsäure, $C_{15}H_{18}O_4$, ist als antibiotisch aktiver Sesquiterpenaldehyd aus dem Basidiomyceten *Marasmius conigenus* (Pers. ex Fr.) Karst (≙ *Strobilurus stephanocystis* (Hora) Sing.) beschrieben (KAVANAGH et al., 1949; DUGAN et al., 1966).

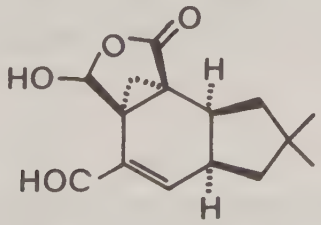
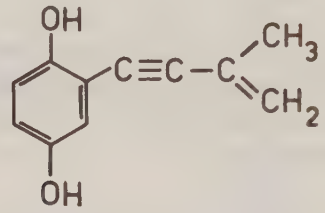


Abb. 11: Marasminsäure

3.5.3. Siccayne

MS- und NMR-Spektroskopie bestätigten die Identität des von *Halocyphina villosa* gebildeten Antibiotikums mit Siccayne. Siccayne (4-(2,4-dihydroxyphenyl)-2-methyl-1-buten-3-in) wurde 1968 von ISHIBASHI et al. aus Kulturen des Deuteromyceten *Helminthosporium siccans* isoliert.



Molekulargewicht: 174
Summenformel: $C_{11}H_{10}O_2$

Abb. 12: Siccayne

3.5.4. Scorodonin

Scorodonin aus *Marasmius scorodonius* ist ein chlorierter Polyin-Alkohol mit einer neuen, bisher noch aus keinem anderen Organismus bekannten Struktur.

$Cl - CH_2 - C \equiv C - CH = C = CH - CH_2OH$

Molekulargewicht: 141
Summenformel: C_7H_7ClO

Abb. 13: Scorodonin

Charakteristisch ist die Kohlenstoff-Dreifachbindung, die in Konjugation zu einer Allen-Gruppierung steht. Eine Publikation dieser Verbindung ist in Vorbereitung (ANKE et al., 1980).

3.5.5. K-322

Die bisher vorliegenden Daten zu dem Antibiotikum aus *Flagelloscypha pilatii* lassen nach MS- und NMR-Untersuchungen folgendes erkennen:

Die Substanz enthält als Kern einen Sesquiterpenalkohol der Bruttozusammensetzung

$$C_{15}H_{16}O_5,$$

der mit verschiedenen kurzkettigen Carbonsäuren verestert ist. Das Antibiotikum stellt also ein Gemisch dar, wobei Capronsäure und eine β^2-C_7-Säure die Hauptkomponenten der Seitenkette bilden.

3.5.6. K-24375/1, K-24375/2 und K-24375/3

Die drei Verbindungen haben enge strukturelle Verbindungen und sind Sesquiterpene. Die in ihren IR-Spektren sehr ähnlichen Substanzen K-24375/1 und K-24375/3 setzen sich - nach Hochauflösung der Molekülionen im Massenspektrum - wie folgt zusammen:

K-24375/1:	$C_{15}H_{20}O_3$	Molekulargewicht 248
K-24375/3:	$C_{15}H_{18}O_3$	Molekulargewicht 246

Für K-24375/2 konnte ein Molekulargewicht von 260 ermittelt werden, dem die Summenformel $C_{15}H_{16}O_4$ entspricht.

NMR-spektroskopisch läßt sich für alle drei Antibiotika als Partialstruktur eine α-Methylen-keton-Gruppierung nachweisen. K-24375/1 hat ein Hirsutan-Grundskelett (MELLOWS et MANTLE, 1973).

3.6. BIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER ANTIBIOTIKA

Anmerkung: Die unter 3.6. zusammengefaßten Versuche zur Wirkungsweise wurden - soweit möglich - mit allen isolierten Antibiotika durchgeführt. Zu einigen wenigen Experimenten standen nicht alle Substanzen zur Verfügung.

3.6.1. Wirkungsspektren

Die minimalen Hemmkonzentrationen aller Antibiotika bei verschiedenen Mikroorganismen wurden im Reihenverdünnungstest ermittelt. Sie sind in den folgenden Tabellen 2, 3 und 4 zusammengefaßt.

Tabelle 2: Minimale Hemmkonzentrationen von K-322 und Marasminsäure

	MHK (µg/ml)	
	K-322	Marasminsäure
1. Bakterien		
Pseudomonadales		
Pseudomonas fluorescens	> 50	> 50
Eubacteriales, Gram-negativ		
Aerobacter aerogenes	> 50	> 50
Escherichia coli	> 50	2
Proteus vulgaris	50	5
Eubacteriales, Gram-positiv		
Arthrobacter citreus	20	5
Bacillus brevis	5	2
Bacillus subtilis	10	5-10
Corynebacterium insidiosum	5	5-10
Micrococcus roseus	n.g.	10
Mycobacterium phlei	> 50	10-20
Sarcina lutea	50	10
Staphylococcus aureus	50	5-10
Actinomycetales		
Streptomyces PRL 1642	20	5
Streptomyces ATCC 23836	10	5
2. Pilze		
Ascomycetes		
Candida albicans	> 50	> 50
Nematospora coryli	10	0,1
Nadsonia fulvescens	50	> 50
Saccharomyces cerev. αS 288c	> 50	> 50
Saccharomyces cerev. FL 200	> 50	> 50
Saccharomyces cerev. is 1	> 50	50
Basidiomycetes		
Rhodotorula glutinis	> 50	> 50

n.g. = nicht getestet

Tabelle 3: Minimale Hemmkonzentrationen von K-24375/1, K-24375/2 und K-24375/3

	MHK (µg/ml)		
	K-24375/1	K-24375/2	K-24375/3
1. Bakterien			
Pseudomonadales			
Pseudomonas fluorescens	> 50	> 50	> 50
Eubacteriales, Gram-negativ			
Aerobacter aerogenes	1-10	> 50	1
Escherichia coli	50	> 50	50
Proteus vulgaris	30	30	1-10
Eubacteriales, Gram-positiv			
Arthrobacter citreus	> 50	> 50	50
Bacillus brevis	10-30	1-10	1-10
Bacillus subtilis	30-50	10-30	1-10
Corynebacterium insidiosum	10	30	1
Micrococcus roseus	> 50	> 50	> 50
Mycobacterium phlei	1-10	> 50	1-10
Sarcina lutea	> 50	> 50	> 50
Staphylococcus aureus	> 50	> 50	> 50
Actinomycetales			
Streptomyces PRL 1642	30	30	1-10
Streptomyces ATCC 23836	30	30	1-10
2. Pilze			
Ascomycetes			
Candida albicans	> 50	> 50	30
Nadsonia fulvescens	50	50	50
Saccharomyces cerev. αS 288c	> 50	> 50	30
Saccharomyces cerev. FL 200	> 50	> 50	30
Saccharomyces cerev. is 1	30	50	1-10
Basidiomycetes			
Rhodotorula glutinis	30	> 50	1-10

Tabelle 4: Minimale Hemmkonzentrationen von Siccayne und Scorodonin

	MHK (µg/ml)	
	Siccayne	Scorodonin
1. Bakterien		
Pseudomonadales		
Pseudomonas fluorescens	> 50	n.g.
Eubacteriales, Gram-negativ		
Aerobacter aerogenes	30-50	25.50
Escherichia coli	> 50	> 50
Proteus vulgaris	> 50	10-25
Eubacteriales, Gram-positiv		
Arthrobacter citreus	> 50	> 50
Bacillus brevis	20	50
Bacillus subtilis	> 50	5- 8
Corynebacterium insidiosum	10	25-50
Micrococcus roseus	50	10-50
Mycobacterium phlei	30-50	5-10
Sarcina lutea	> 50	> 50
Staphylococcus aureus	> 50	> 50
Actinomycetales		
Streptomyces PRL 1642	30-50	n.g.
Streptomyces ATCC 23836	30-50	> 50
2. Pilze		
Ascomycetes		
Candida albicans	> 50	10-25
Nematospora coryli	50	n.g.
Nadsonia fulvescens	> 50	25-50
Saccharomyces cerev. αS 288c	> 50	25-50
Saccharomyces cerev. FL 200	> 50	25-50
Saccharomyces cerev. is 1	50	10
Basidiomycetes		
Rhodotorula glutinis	50	> 50

n.g. = nicht getestet

Die Antibiotika - mit Ausnahme von Scorodonin - wurden zusätzlich auf ihre Hemmwirkung gegen Pilze im Agardiffusionstest überprüft. Die bei einer Konzentration von jeweils 50 µg/Rondelle (K-24375/3 20 µg) erzielten Hemmhofdurchmesser sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

Tabelle 5: Hemmwirkung der Antibiotika auf Pilze im Agardiffusionstest

	Hemmhofdurchmesser / mm					
	1	2	3	4	5	6
Ascochyta pisi	-	-	-	-	10	19
Botrytis cinerea	15	10	20	8	14	11
Ceratocystis fimbriata	50	65	40	30	40	35
Mucor hiemalis	13	16	9	-	9	-
Phytophthora infestans	-	8	35	15	35	12
Pleospora herbarum	22	15	25	+	15	15
Sclerotinia fructigena	-	35	30	14	30	15

(1) K-322
(2) Marasminsäure
(3) K-24375/1
(4) K-24375/2
(5) K-24375/3
(6) Siccayne

Alle untersuchten Antibiotika hemmen das Wachstum Gram-positiver und zum Teil Gram-negativer Bakterien sowie das von Pilzen.

Marasminsäure ist die wirksamste Substanz, sie hemmt insbesondere *Escherichia coli* und *Nematospora coryli*. K-322 inhibiert die getesteten Gram-positiven Endosporenbildner sowie Actinomycetales und coryneforme Bakterien. Von den *Pleurotellus*-Antibiotika ist K-24375/2 die insgesamt am schwächsten wirkende Verbindung.

Die minimalen Hemmkonzentrationen für Scorodonin liegen bei empfindlichen Keimen zwischen 10 und 50 µg/ml, von Siccayne muß mindestens 20 - 30 µg/ml zugesetzt werden, um eine Hemmwirkung zu erzielen.

Von den mit dem Agardiffusionstest erfaßten Pilzen - Tabelle 5 - werden die phytopathogenen *Ceratocystis fimbriata* und *Sclerotinia fructigena* besonders stark gehemmt. Die drei Antibiotika aus *Pleurotellus* haben auch einen deutlichen Effekt auf den Pflanzenparasiten *Phytophthora infestans*.

3.6.2. Einfluß auf die Makromolekülsynthesen in vivo

Um die Wirkungsweise der isolierten Antibiotika näher zu charakterisieren, wurde zunächst ihr Einfluß auf die DNA-, RNA- und Proteinsynthese in vivo untersucht. Da von allen Substanzen Pro- und Eukaryonten gleichermaßen gehemmt werden, wurden als Testorganismen für die Einbau-Versuche sowohl *Bacillus brevis* als auch das Ehrlich Ascites Carcinom und Hühnerembryo-Fibroblasten gewählt.

Die Makromolekülsynthesen wurden durch die Inkorporation entsprechender, radioaktiv markierter Vorstufen - ^{14}C-Leucin, ^{14}C-Uridin (Uracil), ^{14}C-Thymidin - in säurefällbares Material verfolgt.

3.6.2.1. *Bacillus brevis* und *subtilis*

Die Versuche wurden wie unter 2.6.4.2. beschrieben durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind die jeweils erzielten Einbauraten zusammengestellt.

Tabelle 5: Wirkung der Antibiotika auf die Protein-, RNA- und DNA-Synthese in Zellen von *Bacillus brevis*

		Einbau (pmol/ml) aus den Vorstufen					
Antibiotikum	µg/ml	^{14}C-Leucin	%*	^{14}C-Uracil	%	^{14}C-Thymidin	%
Kontrolle		2,68	100	423	100	10,6	100
K-322	5	3,05	114	406	96	10,4	98
	20	1,53	57	279	66	0,5	5
Marasminsäure	2	2,94	110	406	96	9,8	93
	10	0,32	12	16	4	0,4	4
K-24375/1	2	2,86	107	435	103	7,7	73
	10	1,02	38	245	58	0,9	9
K-24375/2	2	2,52	94	347	82	8,3	79
	10	2,06	77	321	76	0,8	8
K-24375/3	2	2,76	103	423	100	4,3	41
	10	0,51	19	33	8	0,5	5

* % der Kontrollen ohne Antibiotikum

Bis 25 µg/ml konnte mit Siccayne kein Effekt auf eine der Makromolekülsynthesen erzielt werden.

Die Einbau-Werte in *Bacillus brevis* und *Bacillus subtilis* unter Einfluß von Scorodonin sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Vergleich der Hemmwirkung von Scorodonin auf die Protein-, DNA- und RNA-Synthese von *Bacillus brevis* und *Bacillus subtilis*

	Einbau (pmol/ml) aus den Vorstufen					
	^{14}C-Leucin	%*	^{14}C-Uracil	%	^{14}C-Thymidin	%
Bacillus brevis						
Kontrolle	6,8	100	186	100	16,5	100
Scorodonin, 50 µg/ml	6,0	88	115	62	16,5	100
Bacillus subtilis						
Kontrolle	7,6	100	18,7	100	23,6	100
Scorodonin, 50 µg/ml	4,6	61	8,4	45	18,4	78

* % der Kontrollen ohne Antibiotikum

Marasminsäure sowie K-24375/3 hemmen nach Zugabe von 10 µg/ml Protein-, DNA- und RNA-Synthese zu über 90 %, K-24375/1, K-24375/2 und K-322 blockieren bei hohen Konzentrationen vor allem die Thymidin-Inkorporation. Scorodonin zeigt sowohl in Zellen von *Bacillus brevis* als auch von *Bacillus subtilis* eine deutliche Hemmung des Uridin-Einbaus.

3.6.2.2. Ehrlich Ascites Carcinom

Die nach 2.6.4.1. untersuchten Hemmwirkungen auf Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms sind in den folgenden Abbildungen 14, 15 und 16 dargestellt. Angegeben ist jeweils der Prozentsatz der Hemmung - verglichen mit der Kontrolle (≙ 100 %) - in Abhängigkeit von der Konzentration der Antibiotika.

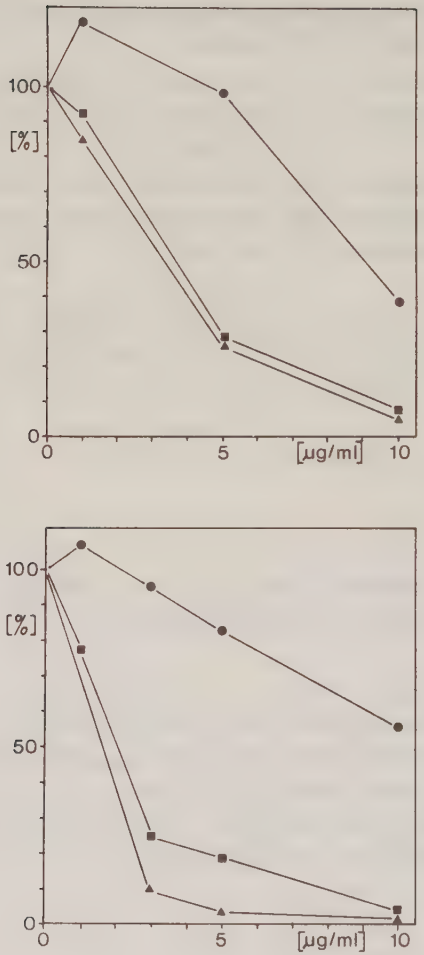


Abb. 14: Wirkung von K-322 und Marasminsäure auf die Makromolekülsynthesen des Ehrlich Ascites Carcinoms

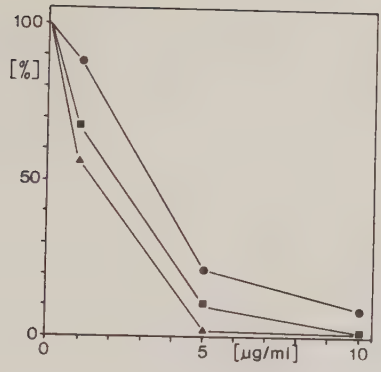
(A) K-322

(B) Marasminsäure

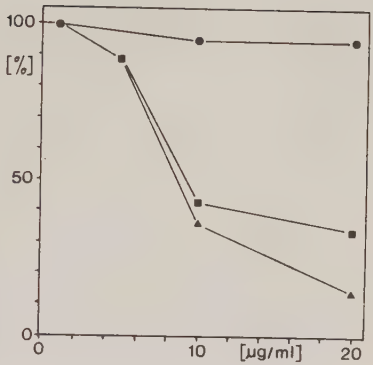
Proteinsynthese (●)

RNA-Synthese (■)

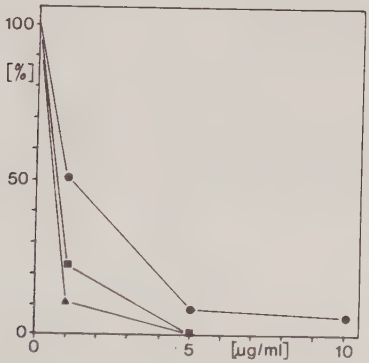
DNA-Synthese (▲)



A



B



C

Abb. 15: Wirkung von K-24375/1, K-24375/2 und K-24375/3 auf die Makromolekülsynthesen des Ehrlich Ascites Carcinoms

(A) K-24375/1

(B) K-24375/2

(C) K-24375/3

Proteinsynthese (●)

RNA-Synthese (■)

DNA-Synthese (▲)

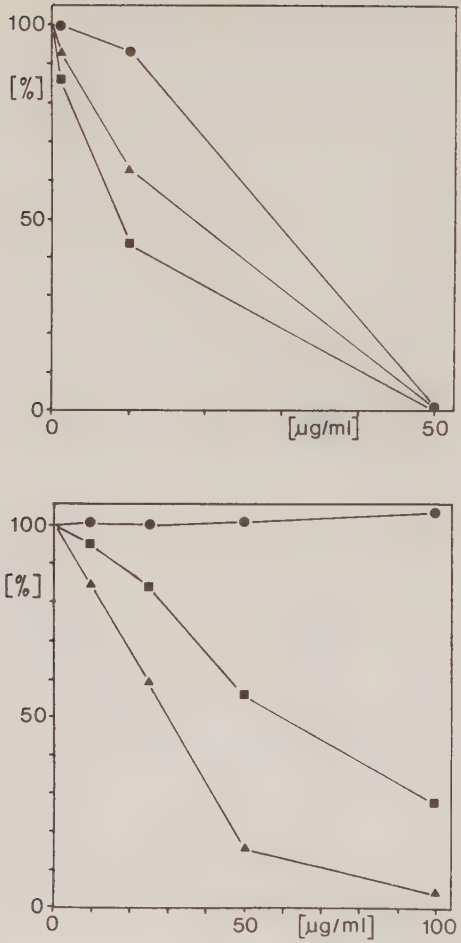


Abb. 16: Wirkung von Siccayne und Scorodonin auf die Makromolekülsynthesen des Ehrlich Ascites Carcinoms

(A) Siccayne

(B) Scorodonin

Proteinsynthese (●)

RNA-Synthese (■)

DNA-Synthese (▲)

Kontrollen ohne Antibiotika: (Einbau in cpm/ml Zellsuspension)

	Protein-Synthese	RNA-Synthese	DNA-Synthese
K-322	12979	10623	924
Marasminsäure	12819	7161	1149
K-24375/1-3	9413	5699	1095
Siccayne	9980	4676	1560
Scorodonin	10640	10500	3520

Wie aus Abb. 14 hervorgeht, hemmt Marasminsäure bevorzugt die Nucleinsäuresynthesen des Ehrlich Ascites Carcinoms. Nach Zugabe von 3 µg/ml sinkt der Leucin-Einbau nur zu 5 %, während die Uridin- und Thymidin-Inkorporation bereits über 80 % gehemmt sind. Die Einwirkung von K-322 führt - bei etwas höheren Konzentrationen - zu ähnlichen Effekten.

Die drei Antibiotika aus *Pleurotellus hypnophilus* unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf Ehrlich Ascites Tumorzellen sehr deutlich (Abb. 15). K-24375/3 ist etwa doppelt so wirksam wie K-24375/1, beide Antibiotika hemmen alle Makromolekülsynthesen gleichermaßen. Durch K-24375/2 ist die Proteinsynthese der Zellen auch bei hohen Konzentrationen nur geringfügig betroffen und für die Hemmung der Nucleinsäuresynthesen werden - verglichen mit K-24375/3 - etwa zehnfach höhere Konzentrationen benötigt.

Eine deutliche Hemmwirkung des Siccaynes - bei gleicher Konzentration auf alle Makromolekülsynthesen gleichzeitig - ist durch Zugabe von 25 - 50 µg/ml zu erreichen (Abb. 16). Scorodonin inhibiert erst mit 50 µg/ml deutlich die DNA-Synthese, etwas schwächer die RNA-Synthese, während keinerlei Einfluß auf die Proteinsynthese festgestellt werden kann (Abb. 16).

3.6.2.3. RSV-transformierte und nicht-transformierte Hühnerembryo-Fibroblasten

Die gleichzeitige Untersuchung von transformierten und normalen, nicht transformierten Hühnerembryo-Fibroblasten aus derselben

Primärkultur ermöglicht das Erkennen einer differenzierten Hemmwirkung der untersuchten Antibiotika.

In den Versuchen wurde die temperatursensitive Mutante tsNY68 des Rous-Sarcoma-Virus verwendet. Mit der Mutante infizierte Hühnerembryo-Fibroblasten weisen bei 41° C den normalen Zellphänotyp auf ("nicht-erlaubte" Temperatur), während sie bei 36° C biochemisch und morphologisch voll transformiert erscheinen ("erlaubte" Temperatur) (KAWAI et HANAFUSA, 1971),

Alle Einbau-Versuche an nicht-transformierten und transformierten Fibroblasten-Zellen wurden dementsprechend bei 36° C - wie unter 2.6.6. beschrieben - durchgeführt.

Die eingesetzten Konzentrationen sind als µg/5 ml Nährlösung (≙ µg/Petrischale, vgl. 2.6.6.) angegeben. Da die Zellzahl pro Petrischale zum Zeitpunkt der Experimente - beim Erreichen des gerade confluenten Stadiums - etwa 2 x 10^6 beträgt, sind die Antibiotika-Konzentrationen direkt mit den µg/ml-Angaben der Ehrlich Ascites Zellsuspension vergleichbar.

Nachfolgend sind die Einbauraten der Vorstufen für die Makromolekülsynthesen tabellarisch in Prozent Aktivität - bezogen auf die Kontrolle (≙ 100 %) - zusammengefaßt. Als Vergleichssubstanzen mit bekanntem Wirkort wurden Actinomycin D und Cycloheximid eingesetzt.

Kontrollen ohne Antibiotika (Einbau in cpm/Petrischale):

	nicht-transformierte Fibroblasten	transformierte Fibroblasten
Proteinsynthese	25656	20484
RNA-Synthese	26708	22152
DNA-Synthese	20058	13440

Tabelle 7: Wirkung der Antibiotika auf die Protein-, DNA- und RNA-Synthese nicht-transformierter und RSV-transformierter Hühnerembryo-Fibroblasten

		Einbau in % der Kontrollen ohne Antibiotikum					
		nicht-transformierte Zellen			transformierte Zellen		
Hemmstoff	µg/5ml	^{3}H-Leu	^{3}H-Uri	^{3}H-Thy	^{3}H-Leu	^{3}H-Uri	^{3}H-Thy*
Crinipellin	0,5				71	84	35
	1	96	93	86			
	2,5	84	76	60	56	72	6
	5	56	49	22	54	13	10
K-322	2,5	75	94	36	77	89	52
	5	54	81	15			
	10	43	41	5	61	28	5
Marasmin-säure	0,5				100	85	83
	1	85	96	68			
	2,5	82	88	16	65	45	13
	5	47	55	6	63	53	2
	10	27	25	0			
K-24375/1	1	91	100	85	100	100	100
	2,5	73	91	37			
	5	43	54	8	57	33	19
K-24375/2	2,5	100	100	81			
	5	84	100	73	100	84	83
	10				61	67	23
	20	24	73	7	55	44	13
K-24375/3	1	82	100	82	100	87	77
	2,5	70	95	49	67	50	20
	5	39	45	12	50	31	15
Siccayne	2,5	100	90	62	89	68	55
	5	68	74	38	66	62	46
	10	32	71	7	53	47	9
Actinomycin D	0,6	93	21	31			
Cycloheximid	2,5	16	115	90			

* ^{3}H-Leu = ^{3}H-Leucin
^{3}H-Uri = ^{3}H-Uridin
^{3}H-Thy = ^{3}H-Thymidin

Wie aus Tabelle 7 hervorgeht, wird in Fibroblasten-Zellen unter dem Einfluß aller getesteten Antibiotika bevorzugt der Einbau von Thymidin in säurefällbares Material gehemmt. Die Inkorporation von Uridin wird demgegenüber - verglichen mit Ehrlich Ascites Zellen - nur zu einem geringeren Prozentsatz reduziert.

Die *Pleurotellus*-Antibiotika, Marasminsäure und K-322 inhibieren nicht-transformierte und transformierte Hühnerembryo-Fibroblasten gleichermaßen und bei Konzentrationen, die auch zur Hemmung von Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms benötigt werden.

Ein deutlicher Effekt des Siccaynes auf Fibroblasten-Zellrasen ist bereits durch Zugabe von 5 µg/5 ml zu erreichen, transformierte und nicht-transformierte Zellen zeigen dabei keine unterschiedliche Sensitivität.

Crinipellin hemmt hingegen bevorzugt - das heißt bei geringeren Konzentrationen - die DNA-Synthese transfomierter Zellen. In normalen Fibroblasten wird der Thymidin-Einbau erst durch die fünf- bis zehnfach höhere Konzentration des Antibiotikums um den gleichen Prozentsatz verringert.

Die Hemmwirkung auf Hühnerembryo-Fibroblasten in Abhängigkeit von der Konzentration ist am Beispiel des Siccaynes und des Crinipellins in der folgenden Abbildung 17 nochmals graphisch veranschaulicht.

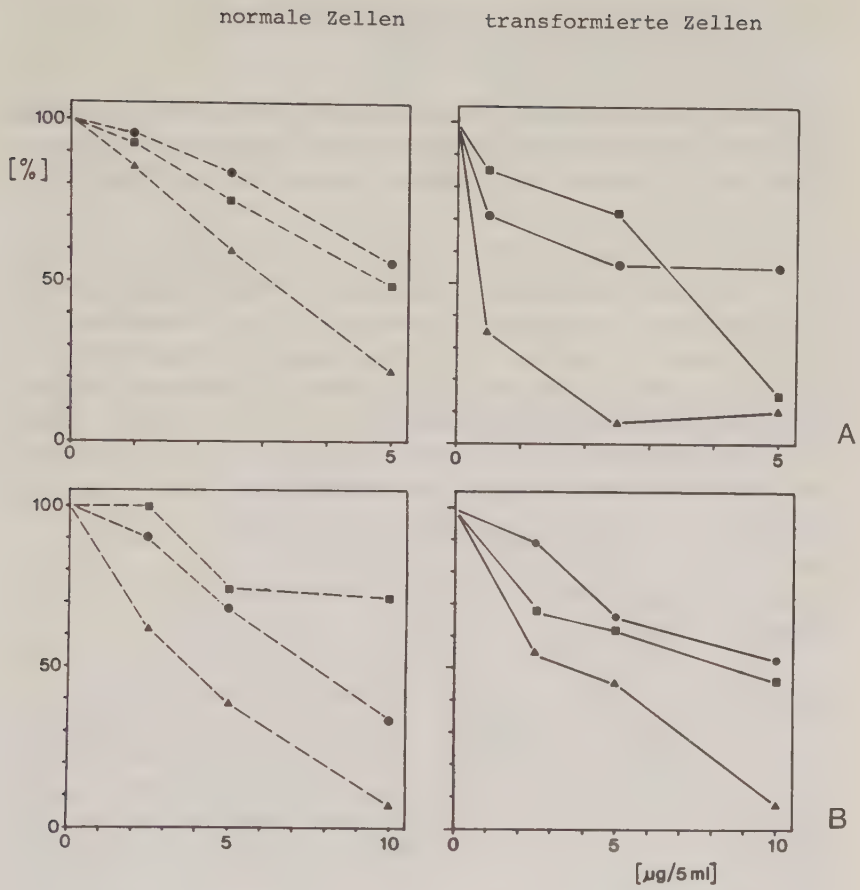


Abb. 17: Wirkung von Crinipellin und Siccayne auf die Protein-, DNA- und RNA-Synthese normaler und transformierter Hühnerembryo-Fibroblasten
(A) Crinipellin
(B) Siccayne

Proteinsynthese (●)
RNA-Synthese (■)
DNA-Synthese (▲)

3.6.3. Einfluß auf die Aufnahme von Vorstufen der Makromolekülsynthesen in vivo

Die Hemmung der Makromolekülsynthesen in vivo kann unter anderem auf einer Hemmung des Transports beruhen, aufgrund dessen die jeweiligen Precursors nicht mehr an den Ort ihres Einbaus in der Zelle gelangen.

Ergänzend zu den unter 3.6.2. dargestellten Versuchen wurde daher an nicht-transformierten Hühnerembryo-Fibroblasten die Aufnahme der Vorstufen in die Zellen getestet. Die nach 2.6.6. durchgeführten Versuche erfassen die gesamte, in die Zelle inkorporierte Radioaktivität einer zugegebenen Vorstufe, die sich aus einem säurelöslichen und einem säurefällbaren Anteil zusammensetzt. Der säurefällbare Anteil entspricht der Einbaurate der Vorstufe in das jeweilige Makromolekül.

Kontrollen ohne Antibiotika (Aufnahme in cpm/Petrischale):
Leucin: 3900
Uridin: 25200
Thymidin: 4800

Tabelle 8: Wirkung der Antibiotika auf die Aufnahme von Leucin, Uridin und Thymidin in nicht-transformierte Hühnerembryo-Fibroblasten

		Aufnahme in % der Kontrollen ohne Antibiotikum		
Hemmstoff	µg/5ml	^{3}H-Leucin	^{3}H-Uridin	^{3}H-Thymidin
Crinipellin	5	57	17	43
K-322	5	101	100	102
Marasminsäure	5	102	109	93
K-24375/1	5	72	72	51
K-24375/2	10	95	96	78
K-24375/3	5	103	84	64
Siccayne	10	55	56	44

Für die Untersuchung der Aufnahme wurde jeweils die Konzentration an Antibiotikum eingesetzt, die in den Einbauversuchen (Tabelle 7) zu einem deutlichen Effekt geführt hat.

Den Werten aus Tabelle 8 ist zu entnehmen, daß weder unter dem Einfluß von K-322 noch unter dem der Marasminsäure die Gesamtmenge der in die Zelle inkorporierten Radioaktivität reduziert wird. Eine partielle Hemmung ist nach Zugabe der Pleurotellus-Antibiotika zu beobachten. Siccayne und vor allem Crinipellin blockieren die Aufnahme der Vorstufen in die Zellen sehr deutlich. 10 µg Siccayne vermindern den Transport aller Precursors jeweils um 50 %, während 5 µg Crinipellin zu einer 83 %igen Hemmung der Uridin-Aufnahme führt.

Ähnliche Ergebnisse wie mit den nicht-transformierten Hühnerembryo-Fibroblasten konnten mit Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms erzielt werden. Auch in Ascites-Tumorzellen hemmen Crinipellin und Siccayne die Aufnahme der Vorstufen sehr stark, während nach Zugabe der anderen Antibiotika nur ein geringer oder gar kein Effekt festgestellt werden kann.

3.6.4. Wirkung auf die RNA- und DNA-Synthese in vitro

3.6.4.1. RNA-Synthese in isolierten Zellkernen des Ehrlich Ascites Carcinoms

Von den drei Gruppen bisher bei Eukaryonten bekannter DNA-abhängiger RNA-Polymerasen sind die Enzyme der Gruppe A im Nucleolus, die der Gruppe B im Nucleus und einige Enzyme der C-Gruppe im Cytoplasma lokalisiert (CHAMBON, 1975).

Untersucht man in isolierten Zellkernen die RNA-Synthese durch Verfolgung des Einbaus von Uridin-Triphosphat, so erfaßt man vor allem die Aktivität der Polymerasen A und B. Initiation, Pyrophosphataustausch und Kettenverlängerung durch die Polymerase B sind α-Amanitin hemmbar, während sich A als insensitiv gegenüber dem Toxin erwies (COCHET-MEILHAC et CHAMBON, 1974).

An isolierten Kernen kann die Wirkung der Antibiotika auf die RNA-Synthese direkt untersucht werden, da alle Transport- und Phosphorylierungsprozesse, die zur unmittelbaren Vorstufe - dem Triphosphat - führen, ausgeschlossen sind.

In dem unter 2.6.8. beschriebenen Versuch wurden die Antibiotika Crinipellin, Marasminsäure, Siccayne, Scorodonin und K-322 getestet. In Tabelle 9 sind ihre Hemmwirkungen auf die RNA-Synthese mit der von α-Amanitin verglichen.

Tabelle 9: Wirkung der Antibiotika auf die RNA-Synthese isolierter Zellkerne des Ehrlich Ascites Carcinoms

Hemmstoff	µg/ml	Einbau von ^{3}H-UMP pmol	% Synthese
Kontrolle 1		2,44	100
α-Amanitin	2	0,85	35
Crinipellin	25	2,34	96
Scorodonin	80	1,90	78
Kontrolle 2		2,14	100
α-Amanitin	2	0,87	41
K-322	8	2,63	123
	80	1,78	83
Marasminsäure	8	1,22	57
	80	0,59	28
Siccayne	40	0,85	40
	80	0,66	31

Mit den eingesetzten mittleren Ionenkonzentrationen wird - wie sich aus den α-Amanitin-Kontrollwerten ergibt - vor allem die Polymerase B-Aktivität erfaßt.

Die getesteten Antibiotika, die alle eine in vivo Hemmung der RNA-Synthese zeigten - vgl. 3.6.2.2. - hemmen den Einbau von UMP in säurefällbares Material sehr unterschiedlich. Crinipellin und K-322 haben keinen Einfluß auf die zellfreie RNA-Synthese, Scorodonin hemmt die UMP-Inkorporation nur um 22 %. Demgegenüber haben sowohl Marasminsäure als auch Siccayne eine starke Hemmwirkung auf die Polymerase-Reaktion, die bereits bei 8 bzw. 40 µg/ml feststellbar ist. Nähere Aufschlüsse über die Art der Hemmung sind diesem Testsystem nicht zu entnehmen.

3.6.4.2. DNS-Synthese in Toluol-behandelten Zellen von *Bacillus brevis*

Toluol-behandelte Bakterienzellen enthalten alle drei DNA-abhängigen DNA-Polymerasen, synthetisieren Makromoleküle aus Triphosphaten nur unter externer Zuführung von ATP und spiegeln die DNA-Replikation in vivo wieder (vgl. MARUYAMA et al., 1978).

Da in den unter 3.6.2.1. beschriebenen Versuchen mit *Bacillus brevis* eine bevorzugte Hemmung der Thymidin-Inkorporation festgestellt worden war, sollte in Analogie zu den Versuchen mit Ehrlich Ascites Zellkernen an Prokaryonten die DNA-Synthese direkt - unter Ausschluß der Transportphänomene - getestet werden. Um eine deutliche Hemmwirkung zu sehen, wurde von jeder Substanz 100 µg/ml eingesetzt.

Die Ergebnisse des nach 2.6.9. durchgeführten Versuchs sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 10: Wirkung der Antibiotika auf die DNA-Synthese Toluol-behandelter *Bacillus brevis* Zellen

Hemmstoff	µg/ml	Einbau von ^{3}H-dTMP pmol	% Synthese
Kontrolle		3,75	100
K-322	100	1,46	39
Marasminsäure	100	2,06	55
K-24375/1	100	2,73	73
K-24375/2	100	3,75	100
Siccayne	100	2,32	62
Scorodonin	100	3,56	95

Den Einbau von Thymidin-Phosphat in DNA hemmen K-322 - 61 % -, Marasminsäure und Siccayne, keine Wirkung zeigen Scorodonin und K-24375/1.

Als Angriffspunkt für die mit K-322, Marasminsäure und Siccayne erzielte Hemmung kommen sämtliche der in die DNA-Replikation involvierten Faktoren in Frage.

3.6.5. Hämolyse-Test

Um zu prüfen, ob die Hemmwirkung der Antibiotika auf einen unspezifischen, detergentienartigen Effekt auf die Cytoplasma-Membran zurückzuführen ist, wurde mit allen Substanzen die Freisetzung von Hämoglobin aus Rinderblut-Erythrozyten untersucht (vgl. 2.6.14.).

Keines der Antibiotika - Crinipellin, K-322, Marasminsäure, K-24375/1-3, Siccayne und Scorodin - wirkte bei 100 µg/ml hämolytisch.

Eine umfangreiche Zerstörung cytoplasmatischer Strukturen kann daher für alle isolierten Verbindungen ausgeschlossen werden.

3.6.6. Prüfung auf mutagene Eigenschaften

Im Ames-Test können Substanzen auf ihre mutagenen Eigenschaften getestet werden. Eine Erhöhung der Mutationsrate (Revertantenzahl) läßt Rückschlüsse auf einen möglichen Angriff der Antibiotika an der DNA zu (McCANN et AMES, 1976).

Die verwendeten *Salmonella typhimurium*-Stämme enthalten neben verschiedenen Typen von Histidin-Mutationen weitere Mutationen, die ihre Empfindlichkeit gegenüber den Agentien steigern (AMES et al., 1975). Eine besonders wirksame Erhöhung der Sensitivität bedeutet der Besitz des R-Faktors für Penicillin-Resistenz (McCANN et al., 1975) in TA 100 und TA 98, die sich von den Penicillin-empfindlichen Stämmen TA 1535 bzw. TA 1538 ableiten.

Die Untersuchung der Antibiotika wurde wie unter 2.6.11. beschrieben durchgeführt, die Ergebnisse sind nachfolgend tabellarisch zusammengefaßt.

Tabelle 11: Einfluß der Antibiotika auf die Revertanten-Zahl aus Histidin-auxotrophen *Salmonella typhimurium*-Mutanten

Hemmstoff	µg/ Rondelle	*Salmonella typhimurium*-Teststämme TA 1535	TA 1538	TA 100	TA 98
NMG*	5	2944 (13)**	- (12)	20750 (12)	- (11)
Crinipellin	100	- (13)	- (12)	- (20)	- (10)
K-322	100	- (15)	- (22)	- (18)	148 (25)
Marasminsäure	50	- (32)	- (36)	- (35)	344 (50)
K-24375/1	20	- (25)	- (20)	400 (28)	- (20)
K-24375/2	20	- (35)	- (30)	165 (37)	- (39)
K-24375/3	20	- (25)	- (28)	400 (32)	- (30)
Siccayne	100	- (15)	- (18)	- (15)	- (20)
Scorodonin	100	- (27)	- (35)	- (24)	- (30)

* N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin

** Zahl in Klammern: Hemmhofdurchmesser in mm
Zahl vor der Klammer: Anzahl der Revertanten in einem Ring um den Hemmhof

Crinipellin, Siccayne und Scorodonin hemmen die getesteten Salmonella-Stämme, induzieren jedoch keine erhöhte Zahl von Rück-Mutationen.

Die *Pleurotellus*-Antibiotika führen in dem Teststamm TA 100 zu einem deutlichen Revertanten-Ring um die Grenze des Hemmhofs. Nach AMES et al. (1975) wird diese Mutation durch Basen-Paarungsfehler hervorgerufen. Auf eine Rasterschub-Mutation (AMES et al., 1975) kann hingegen die Wirkung von Marasminsäure und K-322 auf den Stamm TA 98 zurückgeführt werden.

Bei den insensitiveren Mutanten ohne R-Faktor wurde in keinem Fall - abgesehen von dem Kontroll-Mutagen NMG - ein vermehrtes Auftreten von Revertanten beobachtet (vgl. jedoch 3.7.2.).

Aus den Ergebnissen des Ames-Tests kann als möglicher Wirkort für K-322, Marasminsäure und die *Pleurotellus*-Antibiotika auch die DNA-Replikation oder die DNA selbst in Betracht gezogen werden.

3.7. WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNGSWEISE VON CRINIPELLIN, MARASMINSÄURE, SCORODONIN UND K-24375/1-3

3.7.1. Crinipellin

Vorangegangene Versuche (KUPKA, 1978) hatten zur Wirkungsweise von Crinipellin folgende Ergebnisse erbracht: Crinipellin hemmt Gram-positive Bakterien zwischen 2 und 5 µg/ml, sensitive Pilze zwischen 15 und 30 µg/ml. In Zellen von *Bacillus brevis* und Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms werden bei geringeren Konzentrationen vor allem die Einbauraten für Thymidin und Uridin reduziert, bei höheren Konzentrationen ist auch die Proteinsynthese von der Hemmwirkung betroffen. Weitere Versuche ergaben, daß sowohl in Zellen von *Bacillus brevis* als auch von *Penicillium notatum* nach Zugabe höherer Dosen des Antibiotikums der Sauerstoffverbrauch deutlich sinkt. Eine hämolytische Wirkung auf Human-Erythrozyten konnte nicht beobachtet werden.

Die Resultate aus den unter 3.6.3. und 3.6.4.1. aufgeführten Experimenten lassen erkennen, daß Crinipellin mit der Aufnahme von Vorstufen für die Makromolekülsynthesen interferiert, ohne in isolierten Zellkernen die RNA-Synthese selbst zu beeinflussen.

Mit den folgenden Untersuchungen sollte die Wirkungsweise des Diterpen-Antibiotikums noch näher charakterisiert werden.

3.7.1.1. Einfluß auf die Sauerstoffaufnahme und die oxidative Phosphorylierung isolierter Rattenlebermitochondrien

Die bei Pro- und Eukaryonten festgestellte Hemmung des Sauerstoffverbrauchs ganzer Zellen nach Zugabe von Crinipellin könnte auf der Blockierung der Atmungskette bzw. der damit gekoppelten ATP-Bildung beruhen. Die beobachtete Wirkung auf die Makromolekülsynthesen wäre dann als Sekundäreffekt aufgrund von ATP-Substratlimitierung zu interpretieren. An isolierten Mitochondrien sollte daher der Einfluß von Crinipellin auf den

Sauerstoffverbrauch und die oxidative Phosphorylierung direkt getestet werden.

Den nach 2.6.10. durchgeführten Versuch gibt die folgende Abbildung 18 wieder.

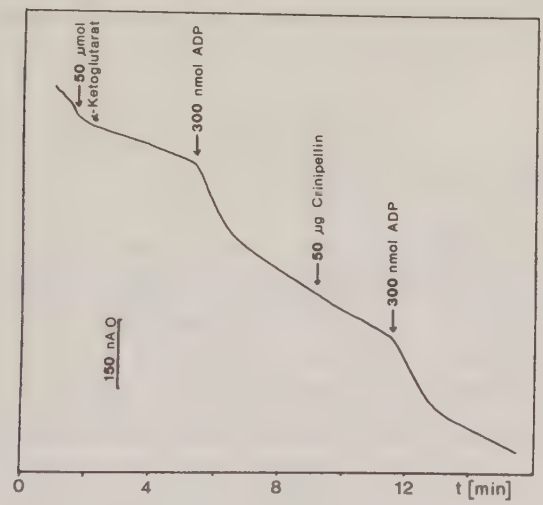


Abb. 18: Sauerstoffverbrauch isolierter Rattenlebermitochondrien unter Einwirkung von Crinipellin

Das als Substrat verwendete α-Ketoglutarat wird über das Flavoprotein 6 (LEHNINGER, 1977) in den Anfang der Elektronentransportkette eingeschleust. Aus dem Verhältnis des nach Zugabe von α-Ketoglutarat eingestellten Atmungszustands 4 zu dem ADP-induzierten Atmungszustand 3 ergibt sich für die isolierten Mitochondrien ein Atmungskontrollkoeffizient von 5,4 (Berechnung nach LESSLER und BRIERLEY, 1969). Als P/O-Verhältnis wurde 1,9 berechnet.

Die Zugabe von 50 µg Crinipellin führt - wie die Abbildung zeigt - zu keiner Veränderung des Atmungszustands 4 und auch

zu keiner merklichen Beeinflussung des P/O-Verhältnisses (1,7 statt 1,9).

Aus diesen beiden Ergebnissen kann geschlossen werden, daß Crinipellin bei den verwendeten Konzentrationen in Rattenlebermitochondrien weder die Elektronentransportkette blockiert, noch als entkoppelndes Agens reagiert oder die oxidative Phosphorylierung hemmt. Die beobachtete Hemmung des Sauerstoffverbrauchs ganzer Zellen scheint daher eher als Sekundäreffekt interpretierbar zu sein.

3.7.1.2. Vergleich von Uridin-Aufnahme und Einbau in *Bacillus brevis* Zellen

Vorangegangene Ergebnisse hatten gezeigt, daß Crinipellin in ganzen Zellen sehr stark die RNA-Synthese hemmt (KUPKA, 1978).

Mit dem folgenden Versuch sollte die Einwirkung von Crinipellin auf die Uridin-Aufnahme und die RNA-Synthese in Zellen von *Bacillus brevis* verglichen werden.

In Abständen von je 2 Minuten wurden der Zellsuspension zwei Proben entnommen, von denen die eine mit TCA gefällt, die andere direkt auf einen Membranfilter pipettiert und sofort gewaschen wurde (vgl. 2.6.5.2.). In der folgenden Abbildung 19 sind die Werte einer Crinipellin-vorbehandelten Kultur denen der Kontrolle gegenübergestellt.

Aus der Gegenüberstellung wird ersichtlich, daß mit Crinipellin eine deutliche Hemmung der Uridin-Aufnahme in die Zellen erreicht wird. Man kann jedoch auch erkennen, daß sich das Verhältnis des aufgenommenen zu inkorporiertem Uridin verglichen mit der Kontrolle nach Crinipellin-Behandlung nicht wesentlich ändert. Nach 9 Minuten sind in dem Kontroll-Versuch 59 % der Gesamt-Radioaktivität im säurefällbaren Anteil eingebaut, in den Crinipellin-behandelten Zellen 54 %. Der kleine Teil des nach Crinipellin-Einwirkung noch in die Zellen gelangenden Uridins scheint in seiner weiteren Metabolisierung nicht mehr durch das Antibiotikum gehemmt zu werden.

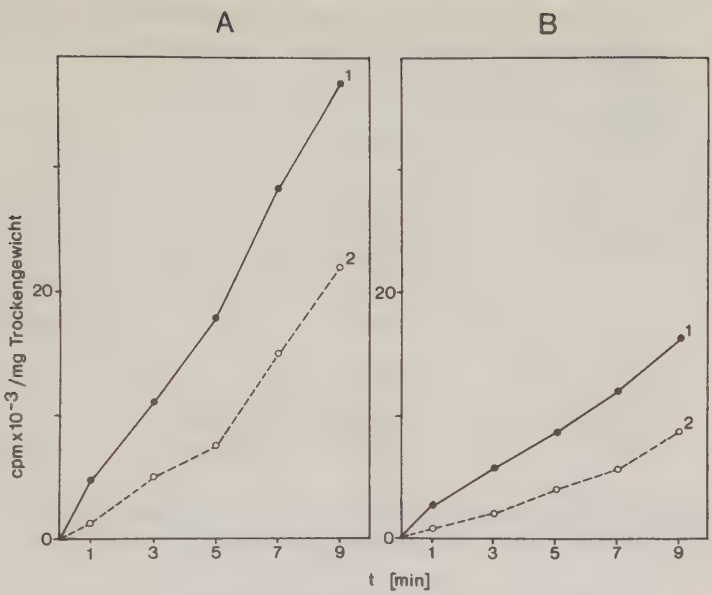


Abb. 19: Vergleich von Uridin-Aufnahme und RNA-Synthese in *Bacillus brevis* Zellen

_____ : Uridin-Aufbau
-------- : Uridin-Einbau

(A) Kontrolle
(B) 6 µg/ml Crinipellin

3.7.1.3. Wirkung auf den Transport verschiedener Vorstufen in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms

Die Hemmwirkung von Crinipellin auf den Transport oder mit ihm zusammenhängende Prozesse wurde in Ehrlich Ascites Zellen mit verschiedenen Vorstufen untersucht.

Der Einfluß auf die Aufnahme von Uridin, AIB und Glucose in ganze Zellen (vgl. 2.6.5.1.) in Abhängigkeit von der Konzentration des Hemmstoffs ist in Abbildung 20 dargestellt.

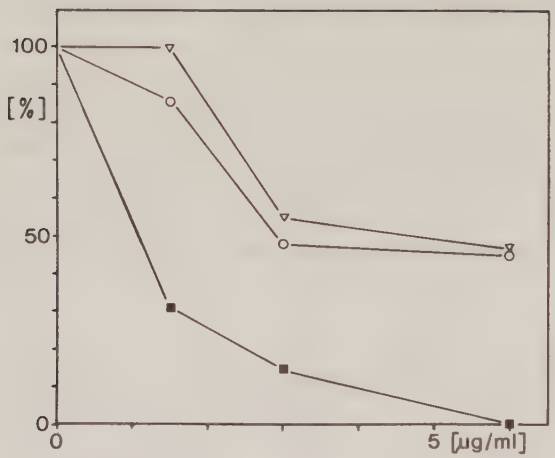


Abb. 20: Einfluß von Crinipellin auf die Aufnahme von Uridin, AIB und Glucose in Ehrlich Ascites Zellen

Glucose (▽) (Kontrolle, 100 % ≙ 23106 cpm/ml)
AIB (O) (Kontrolle, 100 % ≙ 1919 cpm/ml)
Uridin (■) (Kontrolle, 100 % ≙ 9422 cpm/ml)

Die Uridin-Aufnahme wird durch Crinipellin in Ehrlich Ascites Zellen wesentlich stärker gehemmt als die von AIB und Glucose. Da AIB von der Zelle zwar transportiert, aber nicht weiter verarbeitet werden kann (MEISTER, 1965), spiegeln die erreichten Werte die reine Transportrate ohne interferierende Metabolisierung wieder.

Aufgrund des ausgeprägten Effekts auf die Uridin-Aufnahme wurde der Transport weiterer Nucleoside auf Hemmbarkeit durch Crinipellin untersucht (2.6.5.1.). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 12 zusammengefaßt.

Crinipellin hemmt sehr deutlich die Aufnahme aller getesteten Nucleoside, die der desoxy-Nucleoside scheint etwa um den Faktor 2,5 weniger inhibiert zu werden.

Tabelle 12: Einfluß von Crinipellin auf den Nucleosid-Transport in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms

Nucleosid	Aufnahme in cpm/ml Kontrolle	5 µg/ml Crinipellin	% der Kontrolle
^{14}C-Uridin	16716	1663	10
^{14}C-Thymidin	2071	1375	66
^{14}C-Adenosin	45618	4569	10
^{3}H-dAdenosin	102777	24943	24
^{3}H-Cytidin	36524	5283	15
^{3}H-dCytidin	10464	2942	28
^{14}C-Guanosin	6681	651	10

3.7.1.4. Einfluß auf den Gehalt an säurelöslichen Uridin-Nucleotiden in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms

Die Aufnahme der meisten Nucleoside in eukaryonte Zellen setzt sich aus zwei, teilweise voneinander unabhängigen und unabhängig regulierten Vorgängen zusammen: Dem eigentlichen Transport durch die Cytoplasma-Membran und der sofort daran anschließenden Phosphorylierung durch spezifische Kinasen (PLAGEMANN et RICHEY, 1974; BERLIN et OLIVER, 1974). Die Phosphorylierung erfolgt so rasch, daß intrazellulär mit gängigen Methoden praktisch kein freies Nucleosid nachgewiesen werden kann (PLAGEMANN et RICHEY, 1974).

In der unter 2.6.7. beschriebenen Versuchsanordnung sollte überprüft werden, welcher der beiden an der Uridin-Aufnahme beteiligten Prozesse - der Transport oder die einzelnen Phosphoylierungsschritte - durch Crinipellin gehemmt wird.

Abbildung 21 gibt die Zusammensetzung des Nucleosid- und Nucleotid-Pools nach Dünnschicht-Chromatographie wieder.

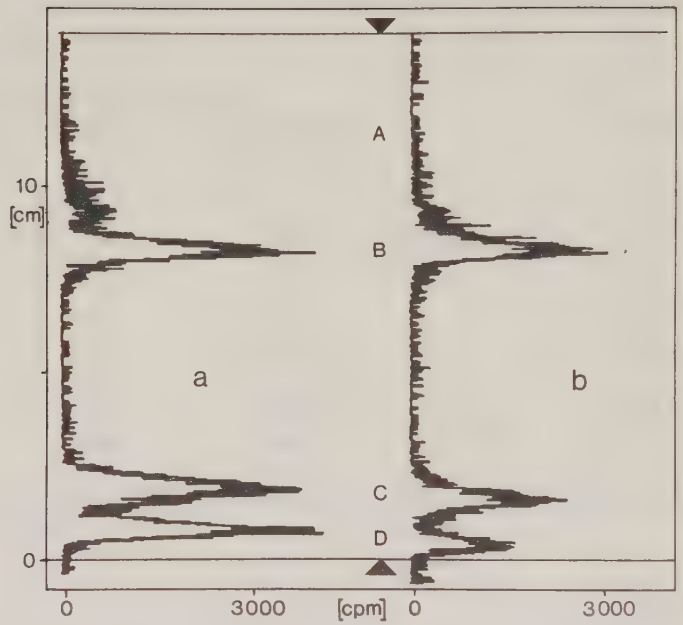


Abb. 21: Auftrennung der Uridin-Nucleotide aus Ehrlich Ascites Zellen an PEI-beschichteten Cellulose-Platten

(a) Kontrolle ohne Antibiotikum
(b) 10 µg/ml Crinipellin

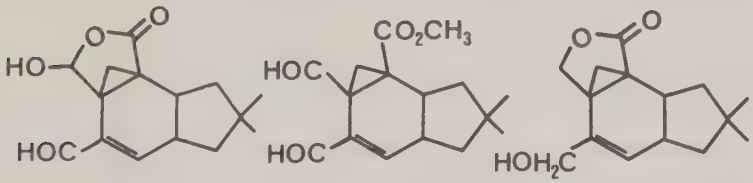
Laufstrecke von Uridin (A), UMP (B), UDP (C), UTP (D)

Die Zellen wurden nach zweiminütiger Inkubation mit markiertem Uridin abzentrifugiert, gewaschen und mit Ameisensäure aufgeschlossen. Wie die Kontrolle zeigt, verteilt sich die von den Zellen aufgenommene Radioaktivität auf UMP, UDP und UTP, Uridin selbst ist nicht nachweisbar. 10 µg/ml Crinipellin (auf die fünffach höhere Zellkonzentration, verglichen mit den Einbauversuchen) reduzieren den Pool als Ganzes auf 60 % und verändern auch das Verteilungsmuster der einzelnen Nucleotide. Während sich der Uridin-Nucleotid-Pool unbehandelter Zellen aus 29 % UTP, 36 % UDP und 35 % UMP zusammensetzt, häuft sich unter

Crinipellin-Einfluß UMP an (47 %), der UDP- (34 %) und vor allem UTP-Anteil (19 %) sind demgegenüber verringert. Die Werte wurden durch Auskratzen der radioaktiv markierten Banden und nachfolgendem Zählen in Szintillationsflüssigkeit ermittelt. Eine spezifische Hemmung einer der Phosphorylierungsschritte durch Crinipellin erscheint aufgrund der vorliegenden Daten wenig wahrscheinlich.

3.7.2. Marasminsäure

Von Marasminsäure wurden durch Herrn Professor STEGLICH und Herrn GIANNETTI zwei Derivate hergestellt, die in ihrer antibiotischen Wirkung mit der des Ausgangsstoffes verglichen werden konnten.



Marasminsäure | Methyl-Marasmat | Reduziertes Lacton-Derivat der Marasminsäure

Abb. 22: Marasminsäure-Derivate

Die antibiotische Wirkung der drei Substanzen wurde im Agardiffusionstest verglichen. Wie aus Tabelle 13 hervorgeht, ist das reduzierte Lacton nicht mehr antibiotisch aktiv.

Tabelle 13: Vergleich der Hemmhofdurchmesser von Marasminsäure mit denen zweier Derivate

Hemmstoff	µg/ Rondelle	Testorganismus Hemmhofdurchmesser in mm *Bacillus brevis*	*Bacillus subtilis*	*Escherichia coli*	*Penicillium notatum*
Marasminsäure	10	19	14	10	-
Methyl-Marasmat	10	11	10	-	15
Reduziertes Lacton-Derivat	20	-	-	-	-

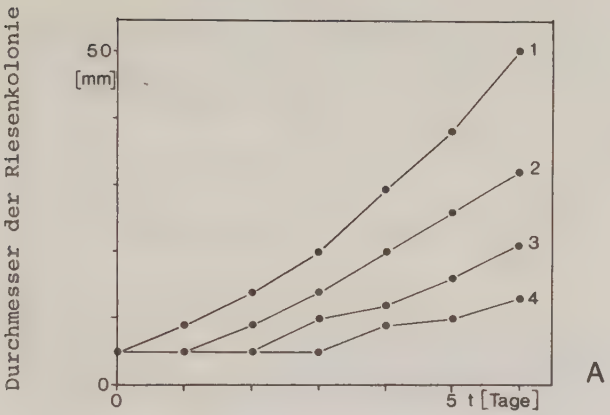
Methyl-Marasmat wirkt gleichfalls antibakteriell und hemmt zusätzlich *Penicillium notatum*, bei dem durch Marasminsäure auch mit 30 µg/Rondelle kein Hemmhof zu beobachten ist. Die Einwirkung des Esters auf Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms führt bei gleichen Konzentrationen zu den gleichen Hemmungen der Makromolekülsynthesen wie durch Marasminsäure (vgl. Abb. 14). Methyl-Marasmat induziert im Ames-Test (vgl. 3.6.6.) ebenfalls eine Erhöhung der Revertantenzahl im Stamm TA 98, zusätzlich jedoch auch in seinem Ausgangsstamm TA 1538 und in TA 100.

3.7.3. Scorodonin

3.7.3.1. Einfluß auf das Wachstum von *Pythium debaryanum* und *Rhizoctonia solani*

Scorodonin wird als leicht gelbliches Öl isoliert, das unter Tageslicht und Stehen bei Zimmertemperatur rasch zu einer braunen Masse polymerisiert.

Die Wirkung der Acetylen-Verbindung auf das Wachstum von Pilz-Kolonien wurde nach der unter 2.6.2. beschriebenen Methode getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 23 graphisch veranschaulicht.



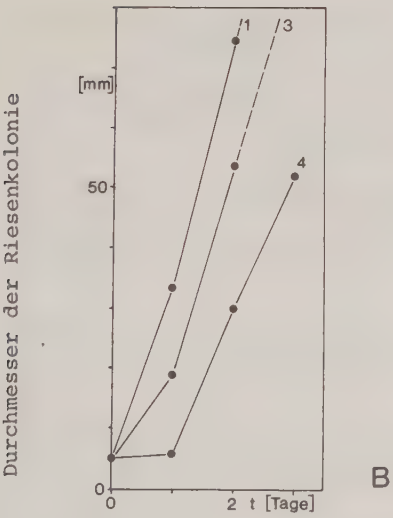


Abb. 23: Einfluß von Scorodonin auf das Wachstum von *Pythium debaryanum* und *Rhizoctonia solani*

(A) *Rhizoctonia solani*
(B) *Pythium debaryanum*

1: Kontrolle ohne Antibiotikum
2: 1,3 µg/ml Scorodonin
3: 13 µg/ml
4: 33 µg/ml

Bei beiden Pilzen verzögert Scorodonin das Anwachsen um ein bis drei Tage, danach jedoch nehmen die Riesenkolonien auch bei den höchsten Scorodonin-Konzentrationen mit den gleichen Zuwachsraten wie die Kontrollen im Durchmesser zu. Dies kann möglicherweise auf den Verlust der antibiotischen Wirkung durch Polymerisation des Acetylens zurückgeführt werden.

3.7.3.2. Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus *Escherichia coli**

In ganzen Zellen von *Bacillus brevis* und *subtilis* (Tabelle 6) konnte eine bevorzugte Hemmung des Uracil-Einbaus durch Scorodonin festgestellt werden. Die Thymidin-Inkorporation wurde durch das Antibiotikum nicht angegriffen. In Übereinstimmung damit ist auch kein Effekt auf die DNA-Synthese toluolisierter *Bacillus brevis* Zellen zu beobachten (Tabelle 10).

Die Hemmung der RNA-Synthese in vitro wurde mit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* untersucht.

Tabelle 14: Einfluß von Scorodonin auf die RNA-Synthese von *Escherichia coli* in vitro

Hemmstoff	µg/ml	Einbau von ^{14}C-AMP nmol	% Synthese
Kontrolle	25	13,7	100
Scorodonin	25	7,8	57
Rifampicin	5	0,5	4

Mit 25 µg/ml Scorodonin konnte eine 43 %ige Hemmung der RNA-Synthese im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden.

* Die Versuche wurden freundlicherweise von Frau Dr. H. ANKE durchgeführt.

3.7.4. K-24375/1, K-24375/2 und K-24375/3

3.7.4.1. Vergleich der antibiotischen und Antitumor-Wirkung mit α-Methylen-γ-lacton-Sesquiterpenen aus Höheren Pflanzen

Als gemeinsames Strukturelement für die Antibiotika aus *Pleurotellus hypnophilus* wurde eine α-Methylen-keton-Gruppierung am Sesquiterpengrundgerüst ermittelt.

Weitaus die größte Gruppe von Naturstoffen, die eine exocyclische Methylengruppierung tragen, ist aus Höheren Pflanzen isoliert worden, insbesondere aus der Ordnung Asterales. Bei diesen Verbindungen befindet sich die Methylengruppe in α-Stellung zu einem γ-Lacton-Ring. Viele sind als Antibiotika bzw. als Cytostatika beschrieben; eine Zusammenstellung ihrer biologischen Wirkungen befindet sich bei RODRIGUEZ et al. (1976).

Professor F. BOHLMANN, Berlin, stellte freundlicherweise eine Reihe neuer α-Methylen-γ-lactone mit verschiedenen Sesquiterpengrundgerüsten aus seiner Arbeitsgruppe zur Verfügung. Sie wurden im Agardiffusionstest in ihrer antibiotischen und gegen Ehrlich Ascites Zellen in ihrer cytotoxischen Wirkung mit den *Pleurotellus*-Antibiotika verglichen.

Die Ergebnisse sind in den beiden folgenden Tabellen 15 und 16 zusammengefaßt.

Tabelle 15: Vergleich der antibakteriellen und antifungischen Aktivitäten von K-24375/3 mit Sesquiterpenen aus Höheren Pflanzen

1) aus *Inula helenium* L. und *Inula royleana* DC (BOHLMANN et al., 1978)
2) aus *Inula helenium* L. (BOHLMANN et al., 1978)
3) aus *Athanasia montana* Wood (BOHLMANN et KNOLL, 1978)
4) aus *Athanasia montana* Wood (BOHLMANN et KNOLL, 1978)
5) aus *Eupatorium perfoliatum* L. (BOHLMANN et al., 1977)
6) aus *Telekia speciosa* (Schreber) Baumg. (BOHLMANN et MAHANTA, 1978)
7) Umlagerungsprodukt aus *Cnicothamnus lorentzii* Griseb. (BOHLMANN et ZDERO, 1978)

Tabelle 15:

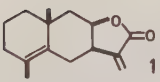
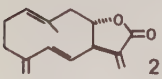
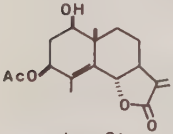
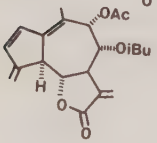
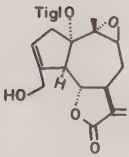
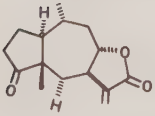
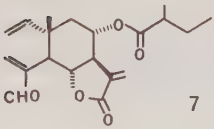
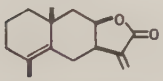
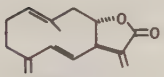
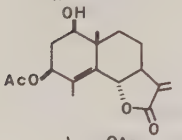
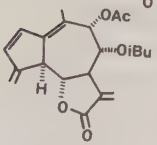
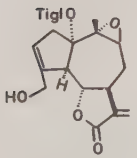
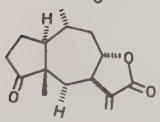
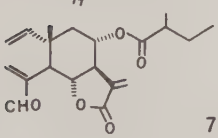
Hemmstoff	µg/ml	Testorganismen Hemmhofdurchmesser in mm *Bacillus brevis*	*Bacillus subtilis*	*Penicillium notatum*	*Eremothecium ashbyi*
K-24375/1	20	27	27	9	15
K-24375/2	20	35	21	-	+
K-24375/3	20	38	39	15	20
 1	100	17	14	10	36
 2	100	19	10	9	36
 3	100	21	8	-	27
 4	100	29	15	-	28
 5	100	17	11	20	34
 6	100	27	18	13	40
 7	100	24	11	10	n.g.

Tabelle 16: Vergleich der Hemmwirkung von K-24375/1-3 auf Ehrlich Ascites Zellen mit Sesquiterpenen aus Höheren Pflanzen

Hemmstoff	µg/ml	% Einbau verglichen mit der Kontrolle (≙ 100 %) ^{14}C-Leucin	^{14}C-Uridin	^{14}C-Thymidin
K-24375/1	10	9	0	0
K-24375/2	20	95	34	14
K-24375/3	10	6	0	0
 1	20	49	16	28
 2	20	34	10	33
 3	20	100	37	51
 4	20	102	17	27
 5	20	81	6	2
 6	20	127	28	58
 7	20	52	5	11

Die Versuche an Ehrlich Ascites Zellen wurden wie unter 2.6.4.1. beschrieben durchgeführt.

Kontrollen ohne Antibiotika (Einbau in cpm/ml):

^{14}C-Leucin:	12318
^{14}C-Uridin:	5695
^{14}C-Thymidin:	1643

Die getesteten Sesquiterpene aus Höheren Pflanzen gehören zur Gruppe der Eudesmanolide (1 und 3), Guianolide (4 und 5), Pseudoguajanolide (6) und Germacranolide (2).

Wie Tabelle 15 zeigt, ist ihre Hemmwirkung gegen Bakterien und Pilze wesentlich schwächer als die der *Pleurotellus*-Antibiotika. Ihre fünffach höhere Konzentration führt lediglich gegen *Eremothecium ashbyi* zu größeren Hemmhöfen.

Ehrlich Ascites Zellen werden durch je 20 µg/ml der Compositen-Sesquiterpene unterschiedlich beeinflußt. Generell ist jedoch die Uridin-Inkorporation am stärksten gehemmt, gefolgt vom Thymidin-Einbau, während die Wirkung auf die Proteinsynthese je nach Substanz verschieden ist. Auch bei Ehrlich Ascites Zellen ist die erreichte Hemmwirkung allenfalls mit der von K-24375/2 zu vergleichen, K-24375/1 und K-24375/3 hemmen bereits bei wesentlich niedrigeren Konzentrationen (Abb. 15).

3.7.4.2. Biomimetische Versuche mit Cystein

Von α-Methylen-γ-lactonen ist seit längerem bekannt, daß sie an die elektrophile exocyclische Methylengruppierung nucleophile Thiole kovalent addieren und dadurch ihre Hemmwirkung entfalten (KUPCHAN et al., 1971). Umgekehrt werden sie durch Addition an Modell-Nucleophile in ihrer antibiotischen und Antitumor-Wirkung inaktiviert (KUPCHAN et al., 1970).

In dem folgenden biomimetischen Test sollte untersucht werden, ob auch die *Pleurotellus*-Antibiotika als α-Methylen-ketone durch Zugabe des Modell-Thiols Cystein ihre antibakteriellen Eigenschaften verlieren. Die Untersuchung der Umsetzungs-

geschwindigkeit mit Cystein erfolgte wie unter 2.6.12. beschrieben.

Tabelle 16: Einfluß von Cystein auf die antibakteriellen Eigenschaften von K-24375/1-3

Hemmstoff	*Bacillus brevis* Hemmhofdurchmesser in mm						
	10 sec	10	20	30	60 min	K_o	K_{60}
K-24375/1	-	-	-	-	-	16	15
K-24375/2	-	-	-	-	-	22	20
K-24375/3	14	10	+	-	-	26	26
Sesquiterpen-Lacton 1)	13	10	9	+	-	17	17
Sesquiterpen-Lacton 2)	15d	15d	14d	13d	-	13	13

K_o = Kontrolle nach 10 sec
K_{60} = Kontrolle nach 60 min
d = diffuser Hemmhof

Jeweils 100 µg der *Pleurotellus*-Antibiotika bzw. 500 µg der Sesquiterpen-lactone wurden zu einem Überschuß Cystein in Phosphat-Puffer pipettiert und der Lösung zu den angegebenen Zeiten eine 5- bzw. 10 µl-Probe entnommen.

Für K-24375/1 und K-24375/2 ist bereits 10 sec nach Zugabe von Cystein keinerlei antibakterielle Aktivität mehr nachweisbar, K-24375/3 wird im Verlauf von 30 Minuten vollständig inaktiviert. Die beiden zu Vergleichszwecken untersuchten Sesquiterpen-Lactone verlieren ihre Hemmwirkung erst nach einer Stunde. Dünnschichtchromatographisch ist von den Cystein-behandelten *Pleurotellus*-Antibiotika im Gegensatz zur Kontrolle nach 60 Minuten keines mehr nachweisbar, hingegen findet sich auf der DC-Platte ein Ninhydrin-positiver Fleck unweit des Startpunkts (Laufmittel 1, vgl. 2.5.).

Die Vermutung liegt daher nahe, daß auch K-24375/1-3 Cystein an ihre exocyclische Methylengruppierung kovalent addieren. Die im Vergleich zu α-Methylen-γ-lactonen wesentlich erhöhte Umsetzungsgeschwindigkeit mit dem nucleophilen Thiol kann chemisch durch die stärkere Polarisierung der Kohlenstoff-Doppelbindung in Nachbarschaft zu einem Keton, verglichen mit der Nachbarschaft zu einem Lacton, erklärt werden.

3.7.4.3. Einfluß auf die Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe in vitro

α-Methylen-γ-lactone entfalten ihre Hemmwirkung auf Zellen durch Alkylierung Sulfhydryl-Gruppen enthaltender Enzyme (HANSON et al., 1970).

Die Alkohol-Dehydrogenase gehört in die Gruppe der SH-Enzyme; vier ihrer Sulfhydryl-Reste, je eine pro Untereinheit, werden für die Enzymreaktion als essentiell angesehen (AURICCHIO et BRUNI, 1969). Als Modell-Enzym sollte sie daher auf ihre Hemmbarkeit durch die α-Methylen-ketone aus *Pleurotellus* untersucht werden. Als Maß für den Inhibitor-Effekt diente die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms, ausgedrückt in µMol NADH + H^+/min.

Die Durchführung des Enzymtests entsprach der unter 2.6.13. angegebenen Vorschrift.

Tabelle 17: Einfluß von K-24375/1 und K-24375/3 auf die Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe

Hemmstoff	µg/ml	µMol NADH/min	% Stoffumsatz
Kontrolle		0,112	100
K-24375/3	4	0,075	67
K-24375/3	8	0,055	48
K-24375/1	80	0,048	43
NAD-Vorinkubation K-24375/3	4	0,095	85
Äthanol-Vorinkubation K-24375/3	4	0,077	69

Wie aus der Tabelle hervorgeht, hemmen sowohl K-24375/1 als auch K-24375/3 die NADH-Bildung durch das Enzym, K-24375/1 allerdings erst mit zehnfach höheren Konzentrationen. Die Beladung des Enzyms mit Coenzym vor der Antibiotika-Einwirkung führt zu einer partiellen Aufhebung der Hemmung, während die Vorinkubation mit Substrat keinen nennenswerten Effekt hat.

3.7.4.4. Hemmwirkung auf *Avena*-Koleoptil- und *Helianthus*-Hypocotyl-Segmente*

Bereits seit längerem sind α-Methylen-γ-lactone als Antagonisten zu Auxin im sogenannten "Bio-Test" an Koleoptil-Segmenten untersucht worden (SEQUEIRA et al., 1968). Sie hemmen reversibel die Indolessigsäure-induzierte Längenzunahme der Koleoptilen, ohne im Pflanzengewebe am gleichen Rezeptor anzugreifen (SEQUEIRA et al., 1968). In den folgenden Versuchen wurde geprüft, ob auch K-24375/1-3 diesen hemmenden Effekt ausüben. Als Testpflanzen diente je ein Vertreter der monocotylen und dicotylen Spermatophyten.

Die Längen ursprünglich 10 mm langer Segmente wurde nach vierstündiger Inkubation mit Hilfe eines Auflicht-Mikroskops ausgemessen. Die Hemmwirkung von K-24375/1 und K-24375/3 ist sehr stark, begleitet wird sie von einer auffälligen Krümmung der Koleoptil-Segmente.

---

* Der Test wurde freundlicherweise von Herrn O. SPRING durchgeführt.

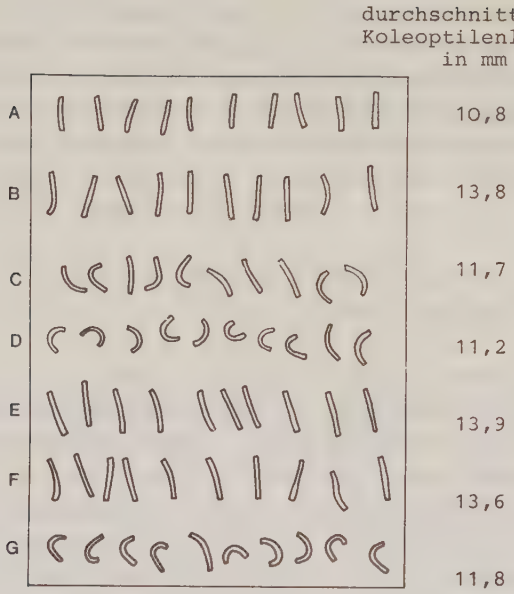


Abb. 24: Einfluß von K-24375/1-3 auf das Längenwachstum von *Avena*-Koleoptil-Segmenten

A (Kontrolle - IES) B (Kontrolle + IES; 1 x 10^{-5}M)
C - G + IES
C (K-24375/1 5 µg/ml) D (K-24375/1 10 µg/ml)
E (K-24375/2 5 µg/ml) F (K-24375/2 10 µg/ml)
G (K-24375/3 1 µg/ml)

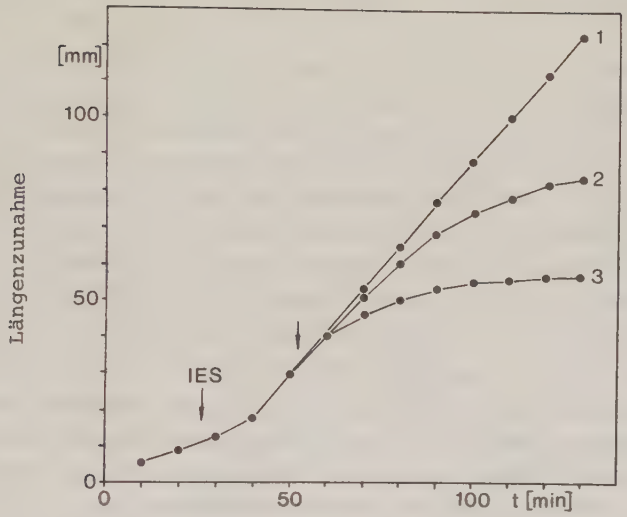


Abb. 25: Zeitlicher Verlauf der Wachstumshemmung von *Helianthus*-Hypocotyl-Segmenten

(1) Kontrolle ohne Hemmstoff
(2) K-24375/3 : 1,6 µg/ml
(3) K-24375/3 : 6,6 µg/ml

-----► Zugabe des Antibiotikums

Mit Wegaufnehmer-Versuchen - vgl. 2.6.15. - wurde der zeitliche Verlauf der Wachstumshemmung durch K-24375/3 untersucht.

Die Hemmung tritt, wie aus der Abbildung zu ersehen ist, nach etwa 5 Minuten ein und führt bei der höheren Konzentration zu nahezu vollständigem Wachstumsstillstand. Verglichen mit Heliangin-Abkömmlingen wirkt K-24375/3 bei etwa zehnfach kleineren Konzentrationen (SPRING, 1980).

Aus den Versuchen zur Wirkungsweise von K-24375/1-3 kann zusammenfassend geschlossen werden, daß die Art der Hemmung wahrscheinlich große Ähnlichkeit mit der von α-Methylen-γ-lactonen hat, aufgrund der größeren Elektrophilie ihrer Methylengruppe die hemmenden Konzentrationen jedoch um den Faktor 10 bis 100 niedriger liegen.

4. DISKUSSION

4.1. CRINIPELLIN

Crinipellin konnte im Verlauf der vorausgegangenen Arbeit (KUPKA, 1978) als kristalline Substanz aus Kulturfiltraten von *Crinipellis stipitaria* TA 7612 isoliert werden. Das Antibiotikum wurde außerdem in allen weiteren isolierten *Crinipellis*-Stämmen nachgewiesen und ist damit vermutlich als artkonstantes Merkmal anzusehen.

Die spektroskopischen Daten sowie die Bruttozusammensetzung $C_{22}H_{28}O_5$ sprechen für ein acetyliertes Diterpen, das drei tertiäre sowie eine sekundäre Methylgruppe enthält. Die Cyathine A_3, B_3 und C_3 (ALLBUTT et al., 1971; AYER et al., 1972, 1973) und die strukturell verwandten Striatine (ANKE et al., 1977; HECHT et al., 1978), Phlebiakauranol und -norkauranol (LISY et al., 1975) sowie das Pleuromutilin (KAVANAGH et al., 1951) sind die bisher einzigen aus Basidiomyceten isolierten Antibiotika mit Diterpengrundgerüst. Aufgrund der Summenformeln und der Partialstrukturen kann die Identität von Crinipellin mit einer dieser Verbindungen ausgeschlossen werden.

Diterpene der verschiedensten Grundgerüste sind aus Höheren Pflanzen, Algen, Korallen und Schwämmen in großer Zahl isoliert worden (Terpenoids and Steroids, Vol. 1 ff.), über ihre biologische Aktivität finden sich jedoch nur vereinzelte Angaben.

Unter den wenigen aus Ascomyceten und zugehörigen Deuteromyceten beschriebenen Diterpenen gewann in jüngster Zeit das von *Cephalosporium aphidicola* Petch (BRAUNDRET et al., 1972), *Nicrospora sphaerica* Sacc. und *Harziella entomophila* Ishiwata et Miyaka produzierte Aphidicolin erneut an Interesse. IKEGAMA et al. (1978) konnten nachweisen, daß das Antibiotikum ausschließlich die eukaryontische DNA-Polymerase α hemmt, ohne in vivo und in vitro einen Effekt auf die Polymerasen β und γ zu zeigen. Nach Ansicht von PEDRALI-NOY und SPADARI (1979) eröffnet diese spezifische Hemmwirkung experimentelle Möglichkeiten,

gezielt den Einfluß von Mutagenen auf den Reparaturmechanismus der DNA-Polymerase β zu untersuchen.

Vergleichende Untersuchungen fehlen zwar, es erscheint jedoch unwahrscheinlich, daß Diterpen-Antibiotika aufgrund ihrer biogenetischen Zusammengehörigkeit gleiche oder ähnliche Wirkungsmechanismen aufweisen. Neben der oben angeführten Hemmung der eukaryontischen DNA-Polymerase wird von pflanzlichen Diterpen-Antibiotika eine Reduzierung der oxidativen Phosphorylierung in isolierten Rattenlebermitochondrien angegeben (YAMAGUCHI et al., 1977), während Pleuromutilin-Derivate in vitro offensichtlich mit der bakteriellen Proteinsynthese interferieren (HODGIN et al., 1974; HÖGENAUER, 1979).

Crinipellin hemmt in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms und in *Bacillus brevis* bevorzugt den Einbau von Uridin und Thymidin und bei höheren Konzentrationen auch den von Leucin (KUPKA, 1978). Dieser Effekt könnte für einen von den Makromolekülsynthesen verschiedenen primären Wirkort sprechen. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit sollten daher zunächst Primär- von Folgereaktionen unterschieden werden, um im Anschluß daran den eigentlichen Angriffsort näher charakterisieren zu können.

Mit ganzen Zellen von *Bacillus brevis* und *Penicillium notatum* war nach Crinipellin-Behandlung ein Abfall des Sauerstoffverbrauchs beobachtet worden. In isolierten Rattenlebermitochondrien ändern 50 µg Crinipellin jedoch weder den Sauerstoffverbrauch des Atmungszustands 4 noch das Verhältnis von gebildetem ATP zu verbrauchtem O_2 (Abb. 18). Eine Hemmung der energieabhängigen Makromolekülsynthesen aufgrund eines Blocks in der mitochondrialen ATP-Synthese kann daher ausgeschlossen werden.

Die RNA-Synthese in vitro wurde an isolierten Zellkernen des Ehrlich Ascites Carcinoms untersucht. Nach MURAMATSU et al. (1970) und HIGASHINAKAGAWA et al. (1972) enthalten die unter Detergenzzusatz isolierten Kerne alle Faktoren nukleärer RNA-Synthese und repräsentieren die in vivo Verhältnisse. 25 µg/ml Crinipellin (Tabelle 9) hatten - verglichen mit der Kontrolle - keinerlei Effekt auf den Einbau von ^{3}H-UMP. Die RNA-Synthese selbst - vertreten durch die Aktivität der Polymerasen A und

B des Kerns (BLUHM, 1974) - wird also durch das Antibiotikum nicht beeinflußt.

Hingegen konnte mit Zellen von *Bacillus brevis* nachgewiesen werden, daß die Hemmung der Uridin-Inkorporation proportional zur Hemmung des Uridin-Transports erfolgt (Abb. 19). Nach PLAGEMANN und RICHEY (1974) ist damit die Blockierung der RNA-Synthese als konsequente Folge der verminderten Aufnahme ihrer Uridin-Vorstufe zu interpretieren.

In Ehrlich Ascites Zellen wurde die Aufnahme weiterer Nucleoside und anderer Vorstufen untersucht. Es zeigte sich (Abb. 20), daß bei Crinipellin-Konzentrationen, die etwas unter den Hemmwerten für die Makromolekülsynthesen liegen (KUPKA, 1978), die Uridin-Aufnahme drastisch reduziert wird, während auch nach Zugabe hoher Dosen des Antibiotikums AIB- und Glucose-Aufnahme nicht unter 50 % der entsprechenden Kontrollwerte sinken. Von den Vorstufen der Nucleinsäuresynthesen ist die Aufnahme der Ribonucleoside stärker reduziert als die der entsprechenden Desoxy-Ribonucleoside (Tabelle 12).

AIB wird von Säugetierzellen über das Transportsystem A für Aminosäuren transportiert (GUIDOTTI et al., 1978), an dem eine Na^+-K^+ ATPase beteiligt ist und das durch einen Na^+-Gradienten energetisiert wird (CHRISTENSEN et al., 1973). Eine spezifische Hemmung dieses Systems, beispielsweise durch Angriff von Crinipellin an der ATPase, kann nicht vorliegen, da sie zu einer bevorzugten Verminderung der Aminosäure-Inkorporation führen würde. Einen solchen Effekt wiesen KUNIMOTO et al. (1973) für Diketocoriolin B, das Derivat eines Basidiomyceten-Sesquiterpens, nach.

Die Aufnahme von Uridin (wie auch von Glucose) besteht in tierischen Zellen aus zwei hintereinandergeschalteten Prozessen: Dem eigentlichen Transport durch die Cytoplasmamembran und der sofort daran anschließenden Phosphorylierung durch spezifische Kinasen (PLAGEMANN et RICHEY, 1974). Insbesondere schnell wachsende (Tumor-)Zellen decken einen großen Teil ihres Nucleosid-Bedarfs über den alternativen "salvage pathway". Ehrlich Ascites Zellen beziehen mehr als 90 % ihrer Nucleinsäure-Vorstufen

aus dem umgebenden Medien, nur 7 % de novo-Synthese ist nachweisbar (FRIDLAND et SCHOLEFIELD, 1969).

Die Hemmwirkung von Crinipellin auf das Uridin Transport- und Phosphorylierungssystem ist daher im Hinblick auf eine mögliche Verwendbarkeit in der Tumor-Therapie von besonderem Interesse.

Übereinstimmend wird in allen tierischen Zellen für den ersten Schritt der Uridin-Aufnahme die Vermittlung durch einen Membran-Carrier und die Unabhängigkeit von Energiezufuhr angegeben (BERLIN et OLIVER, 1975). Außerdem folgt der Vorgang einer Sättigungskinetik und führt nie zu einer Akkumulation unphosphorylierter Nucleoside gegen einen Konzentrationsgradienten (PLAGEMANN et RICHEY, 1974). All dies sind die Kennzeichen der erleichterten Diffusion. Eventuell werden alle Ribo- und Desoxy-Ribonucleoside über ein Transportsystem transportiert, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz (PLAGEMANN et al., 1978). Das Schlüsselenzym der auf den Transport folgenden energieabhängigen Phosphorylierungsschritte ist die im Cytoplasma lokalisierte Uridin-Cytidin-Kinase (BERLIN et OLIVER, 1975), die in Ehrlich Ascites Zellen in Form zweier Isoenzyme, einer adulten und einer embryonalen Form, vorkommt (KRYSTAL et SCHOLEFIELD, 1971). Nach neueren Untersuchungen ist bei höheren Substratkonzentrationen (> 1 µM) die Phosphorylierung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion (PLAGEMANN et al., 1978).

In dem Versuch zur Bestimmung des Uridin-Nucleotid-Gehalts ganzer Zellen (Abb. 21) wurde zwei Minuten inkubiert und 20 µM ^{14}C-Uridin eingesetzt. Unter diesen Bedingungen wird die Phosphorylierung gemessen, die etwa 20 - 30 % unter der Anfangs-Transportrate liegt (PLAGEMANN et al., 1978). Nach Crinipellin-Behandlung konnten alle drei Uridin-Nucleotide, wenn auch reduziert, nachgewiesen werden, so daß das Antibiotikum sicher nicht eine der Uridin-Kinasen selektiv angreift. Die im Verhältnis zur Kontrolle wesentlich erniedrigten Konzentrationen an UDP und UTP können derzeit noch nicht erklärt werden und sollen in einem zellfreien Kinase-Test genauer untersucht werden.

Während bisher noch kein spezifischer Inhibitor der Uridin-Cytidin-Kinase bekannt geworden ist (AHMED et WELCH, 1979), gibt es sehr viele Hemmstoffe, die in den Transportvorgang der Nucleoside eingreifen. Die Nucleosid-Analoga wie zum Beispiel 6-Azauridin interferieren kompetitiv mit dem Transport der natürlichen Nucleinsäure-Vorstufen, indem sie das Carrier-Protein blockieren (PLAGEMANN et RICHEY, 1974). Die Mehrzahl der Inhibitoren hemmt den Nucleosid-Transport jedoch nicht kompetitiv, sondern indirekt über Änderungen von Membranstrukturen. Nach BERLIN und OLIVER (1975) stellen die Transport-Carrier mobile Proteine dar, deren topographische Verteilung durch microtubuläre Strukturen bestimmt wird, und die auch durch die Membran-Lipide beeinflußt werden. Lipophile Inhibitoren - so vermuten sie - greifen primär an der Fluidität oder Organisation der Membran-Lipide an, wodurch eingebettete Proteine in der Lage verändert werden und in der Folge ihre Transportkapazitäten verlieren.

Auch für Crinipellin ist eine eher indirekte Einwirkung auf den Nucleosid-Transport zu vermuten. Da es nicht hämolytisch wirkt, zerstört es zwar nicht die strukturelle Integrität der Cytoplasmamembran in größerem Umfang, hingegen hemmt es neben dem Nucleosid- auch teilweise den AIB- und Glucose-Transport. Die besondere Sensitivität des Uridin-Transports ist nur ein Hinweis auf seine im Verhältnis zu anderen Transport-Systemen größere Labilität; in Zellkulturen zum Beispiel kann er allein durch Serum-Entzug sofort zum Stillstand gebracht werden (PLAGEMANN et al., 1974).

Im direkten Vergleich transformierter und nicht-transformierter Hühnerembryo-Fibroblasten wirkte Crinipellin bevorzugt auf die Virus-transformierten Zellen (Tabelle 7 und Abb. 17). Um den Thymidin-Einbau normaler Fibroblasten im gleichen Ausmaß zu reduzieren, waren etwa fünffach höhere Konzentrationen erforderlich. Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms werden bei vergleichbaren Konzentrationen wie RSV-transformierte Hühnerembryo-Fibroblasten gehemmt.

Zur Transformation der Fibroblasten wurde die temperatursensitive Mutante tsNY68 des Rous-Sarcoma-Virus verwendet. Von den vier Genen seines Genoms codieren zwei für virale Struktur- und Hüllproteine, pol für die Reverse Transcriptase und src für die neoplastische Transformation der Wirtszelle (BISHOP, 1978). Als Produkt von src konnte $p60^{src}$, ein Phosphoprotein mit dem Molekulargewicht 60 000 identifiziert werden (PURCHIO et al., 1978). tsNY68 weist eine Deletions-Mutation im src-Gen auf, die zu einer extremen Instabilität von $p60^{src}$ bei der nicht-erlaubten Temperatur führt (BISHOP, 1978). Das Phosphoprotein ist im Cytoplasma lokalisiert (ROHRSCHNEIDER, 1979) und ist neuesten Untersuchungen mit Immunpräzipitaten zufolge von einer Protein-Kinase-Aktivität begleitet (SEFTON et al., 1979). In dieser Proteinkinase-Aktivität sehen SEFTON et al. (1979) den entscheidenden Schlüssel für den molekularen Mechanismus der Rous-Sarcoma-Virus induzierten Transformation.

Die Expression des src-Gens in infizierten Zellen führt zu einem pleiotropen Effekt, der vor allem Änderungen der Cytoplasma-Membran und ihrer Funktionen umfaßt. Diese Änderungen betreffen die Morphologie, Membran-Transporte, Lectin-Agglutination, Kontakthemmung des Wachstums und die laterale Mobilität von Membran-Komponenten (SUNDQUIST et OTTESKOG, 1978). Insbesondere der höhere Sialinsäure-Gehalt und die veränderten Seitenketten der Glycoproteine (HYNES, 1976; WARREN et al., 1978) werden in transformierten Zellen für wichtig erachtet. Die geringere Mobilität bestimmter Membran-Rezeptoren in transformierten Zellen kann mit der - verglichen zu normalen Zellen - auffällig reduzierten Polymerisation des Actins zu Microfilamenten in Verbindung gebracht werden (ROBBINS et al., 1975; WEBER et al., 1975).

Die Auswirkungen viraler Transformation auf Membranstrukturen sind dermaßen vielgestaltig, daß auf der Grundlage der vorliegenden Versuche nicht entschieden werden kann, welche Struktur oder Funktion transformierter Zellen im Vergleich zu normalen Fibroblasten von Crinipellin bevorzugt angegriffen wird. Es ist jedoch zu vermuten, daß auch hier das Antibiotikum in Wechselwirkung zur Cytoplasma-Membran tritt und dadurch die Carrier-

Aktivitäten der für den am stärksten gehemmten Nucleosid-Transport verantwortlichen Proteine drastisch reduziert.

4.2. K-322 AUS FLAGELLOSCYPHA PILATII

Flagelloscypha pilatii wurde 1975 von AGERER als neue Art der Gattung *Flagelloscypha* beschrieben. Man findet den cyphelloiden Pilz bevorzugt an den basalen, zum Teil abgestorbenen Blattscheiden von Gräsern. Nach den bisher gesammelten Erfahrungen ist er - mindestens im süddeutschen Raum - keine selten vorkommende Art.

Aus Submerskulturen aller vier gesammelten Stämme konnte K-322 isoliert werden, eine Substanz, die nach einigen Wochen aus einer öligen Grundmasse auskristallisiert.

K-322 hat ein Sesquiterpengrundgerüst der Summenformel $C_{15}H_{16}O_5$ und ist über eine Hydroxylgruppe mit verschiedenen C_6- und C_7-Carbonsäuren verestert. Die Esterbindung an zum Beispiel Angelicasäure oder Tiglinsäure ist bei Sesquiterpenen aus Compositen weit verbreitet, bei Basidiomyceten kommt sie seltener vor. Beispiele sind das Coriolin B und C, die beide C_7-Carbonsäuren als Substituenten tragen (TAKAHASHI et al., 1969, 1971).

K-322 hemmt Gram-positive Bakterien und einige Pilze - abgesehen von Bacillus und Corynebacterium - bei vergleichsweise hohen Konzentrationen. Ausgeprägter ist seine cytotoxische Wirkung auf Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms. Virus-transformierte Hühnerembryo-Fibroblasten werden im Vergleich zu normalen Zellkulturen nicht selektiv angegriffen.

Bei Pro- und Eukaryonten sind von der Hemmwirkung vor allem die Nucleinsäuresynthesen betroffen, die DNA-Synthese jeweils stärker als die RNA-Synthese. In vitro wurde die RNA-Synthese isolierter Ehrlich Ascites Zellkerne nicht beeinflußt, hingegen deutlich die DNA-Synthese der Toluol-behandelten *Bacillus brevis* Zellen (Tabelle 10). Bei *Salmonella typhimurium* ruft das

Antibiotikum Rasterschub-Mutationen hervor (Tabelle 11). Nach MUTSUSHITA und KUBITSCHEK (1975) ist in toluolisierten Zellen von *Bacillus subtilis* vor allem die DNA-Replikation über die Aktivität der DNA-Polymerase III meßbar. Es soll nur die Elongationsphase - und nicht die Initiation - ausgehend von bereits vorhandenen Replikationsgabeln erfaßbar sein. Erst in weiterführenden Versuchen kann der Wirkort von K-322 näher abgeklärt werden.

Eine Beobachtung ist jedoch in diesem Zusammenhang von Interesse. Das Antibiotikum bewirkt, wenn es in gereinigter Form auf die Haut gelangt, nach zwei bis drei Tagen ein deutliches Ablösen von Hautschuppen. Eventuell kann man den hautablösenden mit dem enthaarenden Effekt der toxischen Aminosäure Mimosin vergleichen, die aus Samen einer tropischen Fabacee isoliert worden ist (TEITEI et HARRIS, 1979; REISNER et al., 1979). Die Enthaarung von Schafen konnte auf die Hemmung der DNA-Synthese in den Woll-Follikeln zurückgeführt werden. In weiteren Versuchen wurde gezeigt, daß das Toxin in Hepatom-Zellkulturen die Mitose blockiert und außerdem die S-Phase des Zellzyklus besonders Mimosin-empfindlich ist.

Die Wirkungsweise von Mimosin zeigt einige auffällige Gemeinsamkeiten mit K-322, so daß in den weitergehenden Versuchen vor allem geklärt werden soll, ob der neue Basidiomyceten-Metabolit antimitotische Aktivitäten hat.

4.3. MARASMINSÄURE

Marasminsäure wurde 1949 in Kulturfiltraten von *Marasmius conigenus* (Pers. ex Fr.) Karst entdeckt (KAVANAGH et al.), ihre Struktur 17 Jahre später durch DUGAN et al. (1966) aufgeklärt. Einen Beitrag zur Stereochemie der Verbindung lieferten CRADWICK und SIM (1971) und 1976 gelang GREENLOE und WOODWARD die chemische Totalsynthese.

Das Antibiotikum ist bisher nur aus dem Kiefernzapfen bewohnenden *Marasmius*, der heute in die Gattung *Strobilurus* (*S. stephanocystis* (Hora) Sing.) gestellt wird, beschrieben worden. Die beiden weiteren im europäischen Raum vorkommenden Strobilurus-Arten - *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. und *Strobilurus esculentus* (Wulf. ex Fr.) Sing. - produzieren statt Marasminsäure die ausschließlich antifungischen und cytotoxischen Strobilurine A und B (ANKE et al., 1977; SCHRAMM et al., 1978; BÄUERLE, 1979).

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnte Marasminsäure aus Kulturen einer neuen tropischen *Lachnella*-Art isoliert werden. Das Vorkommen der Stubstanz in einem weiteren tropischen *Lachnella*-Stamm JK 542, der vermutlich der gleichen Art zuzuordnen ist, wurde IR-spektroskopisch nachgewiesen.

Marasminsäure stellt einen α,β -ungesättigten Monoaldehyd mit Sesquiterpengrundgerüst dar. Sie gehört zur großen Gruppe der sogenannten "Protoilludan"-Abkömmlinge (TURNER, 1971), zu der als bekanntere Antibiotika weiterhin die Corioline (TAKAHASHI et al., 1969, 1971) und die Illudine (McMORRIS et ANCHEL, 1965) zu rechnen sind. Beide zuletzt genannten Verbindungen haben keine Aldehyd-Funktion.

Marasminsäure läßt sich unter Öffnung des Lactol-Rings chemisch leicht in Methyl-Marasmat umwandeln (Abb. 22). Das Derivat erwies sich gegenüber Ehrlich Ascites Zellen gleichermaßen wirksam, Bakterien hingegen hemmt es etwas schwächer. Da Marasminsäure in Lösung deutlich saures Verhalten zeigt, ist zu vermuten, daß das Antibiotikum zumindest teilweise als freie Säure vorliegt und als solche auch einen Teil ihrer antibiotischen Wirkung entfaltet.

Durch die Öffnung des Lactolrings wird eine zweite Carbonylfunktion vicinal zur bestehenden Aldehyd-Gruppe freigesetzt und es entsteht ein α,β -ungesättigter Dialdehyd. Verbindungen mit dieser Gruppierung sind auch aus Basidiomyceten isoliert worden. Strukturell dem Methyl-Marasmat am nächsten kommt das aus Fruchtkörperextrakten von *Lactarius vellereus* (Fr.) Fr. und *Lactarius pergamenus* (Swartz ex Fr.) Fr. gewonnene Isovelleral

(MAGNUSSON et al., 1972). Es unterscheidet sich nur durch eine Methylgruppe anstelle der methylierten Carboxyl-Funktion. Die Substanz soll neben Velleral für den scharfen Geschmack der Pilze verantwortlich sein (LIST et HACKENBERG, 1969), über ihre antibiotische Wirksamkeit ist nichts bekannt.

Merulidial (QUACK, 1978) ist ebenfalls ein ungesättigter Dialdehyd, mit im Vergleich zum Marasman-Grundskelett verschobenen Substituenten am Sechs-Ring. Die aus Submerskulturen von *Merulius tremellosus* Fr. stammende Substanz ist schwach antibiotisch aktiv, hemmt jedoch sehr stark Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms. Bei verschiedenen Arten der Lebermoos-Gattung *Porella* wird der brennend scharfe Geschmack gleichfalls auf die ungesättigte Dialdehyd-Gruppierung mehrerer Sesqui- und Diterpene zurückgeführt (ASAKAWA et al., 1979). Stark wirksame Fraßhemmstoffe gegen Schnecken sind die aus *Warburga*-Arten (*Canellaceae*) isolierten Dialdehyde Warburganal, Muzigadial, Polypodial und Ugandensidial (NAKANISHI et KUBO, 1977). Die Sesquiterpene blockieren irreversibel den Geschmackssinn der Tiere, so daß sie sich nach Übertragung auf unbehandelte Blätter zu Tode hungern. Für Warburganal wird außerdem eine antifungische Wirkung gegen mehrere Pilze angegeben.

Bei allen genannten Verbindungen wie auch der Marasminsäure selbst kann die biologische Aktivität mit der α-β-ungesättigten Aldehyd-Gruppierung in Verbindung gebracht werden. Durch Reduktion des Aldehyds zum Alkohol geht sowohl bei Merulidial (QUACK, 1978) als auch bei Polypodial (NAKANISHI et KUBO, 1977) die Hemmwirkung verloren. Zu einem entsprechenden Ergebnis führten die Versuche mit dem reduzierten Lactol-Derivat der Marasminsäure (Tabelle 13).

In dem von KAVANAGH et al. (1949) erstellten Wirkungsspektrum der Marasminsäure fällt die sehr geringe minimale Hemmkonzentration von 0,02 µg/ml gegen *Photobacterium fischeri* auf. Der von ihnen getestete *Escherichia coli*-Stamm war wesentlich unempfindlicher als der hier verwendete Stamm K 12. Bei Gram-positiven Bakterien stimmen die Ergebnisse von KAVANAGH et al. (1949) im wesentlichen mit den in Tabelle 2 zusammengestellten Werten überein. Gegenüber der Maus ermittelten sie eine LD_{50}

zwischen 16 und 32 mg/kg. Diese hohe Toxizität zusammen mit der festgestellten Seruminaktivierung verbietet nach Ansicht von KAVANAGH et al. (1949) einen möglichen therapeutischen Einsatz der Marasminsäure.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß transformierte und nicht-transformierte Fibroblasten bei vergleichbaren Konzentrationen gehemmt werden, Marasminsäure also im direkten Vergleich eine unspezifische cytotoxische Wirkung entfaltet.

Eine hohe Toxizität wird auch für das aus *Lampteromyces japonicus* (Kawamura) Sing. und *Clitocybe illudens* Schweinitz isolierte Illudin S angegeben. Hier gelang es jedoch SHINOZAWA et al. (1979) durch Einschluß des Hemmstoffs in Liposomen die Antitumorwirkung auf das Ehrlich Ascites Carcinom in der Maus gezielt zu erhöhen, unter wesentlicher Erniedrigung der Seiteneffekte auf normale Zellen.

Wie Illudin S hemmt Marasminsäure bevorzugt die bakteriellen und eukaryontischen Nucleinsäuresynthesen in ganzen Zellen (Abb. 14). Für Illudin wird als mögliche Struktur-Wirkort-Beziehung eine Alkylierung über den Cyclopropan-Ring oder die α,β -ungesättigte Keto-Funktion vermutet (WALSER et HEINSTEIN, 1973). In mehreren in vitro-Systemen fanden WALSER und HEINSTEIN jedoch keine Hemmung der DNA- und RNA-Synthese durch Illudin, ausgehend von den Nucleosid-Triphosphaten. Da auch Transport und Phosphorylierung der Vorstufen nicht von dem Antibiotikum beeinflußt wurden, konnte der genaue Wirkort von den Autoren bisher noch nicht angegeben werden.

Mit Marasminsäure wurde sowohl ein Effekt auf die RNA-Synthese isolierter Zellkerne des Ehrlich Ascites Carcinoms als auch auf die DNA-Synthese Toluol-behandelter *Bacillus brevis* Zellen erzielt (Tabelle 9 und 10). Die Aufnahme der Vorstufen in die Zellen wird durch das Antibiotikum nicht gehemmt. Diese Beobachtungen stimmen mit den Eigenschaften einer großen Gruppe von Substanzen, die als Hemmstoffe der DNA-Synthese beschrieben sind, überein (COZZARELLI, 1977). Auf der Grundlage der vorliegenden Versuche kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die Marasminsäure als vermutlicher DNA- oder RNA-Synthese-

Hemmstoff über ihre reaktive Aldehyd-Gruppe durch Alkylierung die Polymerasen inaktiviert oder ob sie direkt alkylierend an einer der Basen der DNA-Matrize angreift. Die bei *Salmonella typhimurium* unter Marasminsäure- und verstärkt noch Methyl-Marasmat-Einfluß auftretenden Rasterschub-Mutationen können sowohl durch Interaktion mit den polymerisierenden Enzymen als auch durch Blockierung der Matrizenfunktion erklärt werden (SARNGADHARAN et al., 1978).

Eine mutagene Wirkung auf *Salmonella typhimurium* hatte auch QUACK (1978) mit Merulidial nachweisen können.

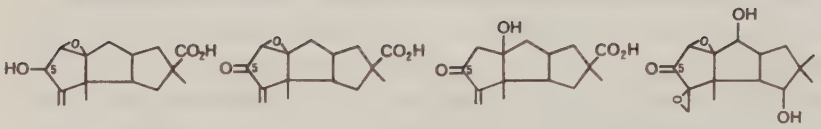
4.4. K-24375/1, K-24375/2 und K-24375/3 aus PLEUROTELLUS HYNOPHILUS

Aus agaricalen Vertretern der Familie *Crepidotaceae*, zu der auch *Pleurotellus* zu rechnen ist, sind bisher noch keine Antibiotika bekannt geworden. Die Fermentation von *Pleurotellus hypnophilus* erwies sich - verglichen mit den anderen bearbeiteten Stämmen - als wesentlich schwieriger, da der Pilz die antibiotisch aktiven Substanzen erst nach zweiwöchiger Fermentationsdauer bildet und auch dann nur in sehr geringen Mengen. Optimierungsversuche durch Verwendung anderer Medien (Medium 2 und 3) führten zu keinem schnelleren Wachstum und keinen höheren Antibiotika-Ausbeuten.

Die drei Substanzen konnten durch Auftrennung am Molekularsieb Sephadex LH-20 als Reinsubstanzen erhalten werden, K-24375/1 und K-24375/3 als Öle, K-24375/2 kristallin.

Alle drei Verbindungen sind Sesquiterpene und enthalten als wichtigste Partialstruktur eine α-Methylen-keton-Gruppierung. K-24375/1 weist ein Hirsutan-Grundskelett auf, über das der beiden anderen Substanzen ist noch nichts bekannt.

Aus Basidiomyceten wurden bisher folgende Sesquiterpene mit Hirsutan-Grundstruktur isoliert:



Hirsutsäure C Complicatsäure Isohirsut-säure C Coriolin

Abb. 26: Verbindungen mit Hirsutan-Grundskelett

Hirsutsäure C ist ein antibiotisch inaktiver Metabolit aus Kulturen von *Stereum hirsutum* (Willd. ex Fr.) S.F. Gray (COMER et al., 1965, 1967), Complicatsäure deren oxidiertes Derivat aus *Sterum complicatum* (Fr.) Fr., das eventuell mit Ramealin identisch ist (MELLOWS et al., 1973). Isohirsutsäure C wurde synthetisch aus Hirsutsäure C hergestellt (MELLOWS et al., 1973). Coriolin (sowie Coriolin B und C) stammt aus Kulturfiltraten von *Coriolus consors* (Berkeley) Imazeki (TAKAHASHI et al., 1969, 1971). Complicatsäure und Isohirsutsäure C hemmen *Staphylococcus aureus* (MANTLE et MELLOWS, 1972; MELLOWS et al., 1973). Die Corioline wurden im Rahmen eines Antitumor-Screenings entdeckt, alle Vertreter mit Keto-Funktion an C-5 haben antibakterielle und ausgeprägte Antitumoreigenschaften. Diketocoriolin B, ein semisynthetisches Derivat, führt zusätzlich bei sehr geringen Konzentrationen zu einer deutlichen Erhöhung der Zahl Antikörper-produzierender Zellen (ISHIZUKA et al., 1972).

Nach den vorliegenden Daten zeigt K-24375/1 Ähnlichkeiten mit Complicatsäure, ist jedoch nicht mit ihr identisch.

Die α-Methylen-keton-Gruppierung ist auch für eine Reihe weiterer, als Antibiotika beschriebene Metabolite charakteristisch. 1953 wurde von UMEZAWA als erster Metabolit in einem Antitumor-Screening aus *Streptomyces erythrochromogenes* Sarkomycin (3-Carboxy-2-methylen-cyclopentanon) isoliert, das bis in die klinische Erprobung gelangte (SUNG, 1967). Ähnliche Verbindungen mit Cyclopentanon-Grundgerüst sind die gleichfalls aus

Streptomyceten stammenden Methylenomycine (HANEISHI et al., 1974a, b, c) sowie Xanthocidin (ASAHI et al., 1966; ASAHI et SUZUKU, 1970).

Aus *Isodon*-Arten, in der japanischen Volksmedizin verwendeten Pflanzen, konnten mehrere Kauran-Diterpene isoliert werden, die als wichtigstes Strukturelement - bezogen auf ihre biologische Aktivität - den α-Methylen-cyclopentanon-Ring enthalten (FUJITA, E. et al., 1970, 1972, 1976a; FUJITA, T. et al., 1979). Encelin und Farinosin, Sekundärmetabolite aus Compositen, tragen die α-Methylen-keton-Gruppierung an einem Santanolid-Sesquiterpen-Grundgerüst (GEISSMAN et MUKHERJEE, 1968; HERZ et al., 1968).

Weitaus die größte Gruppe biologisch aktiver Naturstoffe mit exocyclischer Methylengruppe bilden die α-Methylen-γ-lacton-Sesquiterpene. Als Wirkungsmechanismus für diese Verbindungen konnten KUPCHAN et al. (1970) eine elektrophile Michael-Addition nucleophiler Substrate an die exocyclische Doppelbindung nachweisen. Ein solcher Reaktionsmechanismus wird auch für α-Methylen- und α,β -ungesättigte Ketone postuliert (FUJITA et NAGAO, 1977). Wie bereits KUPCHAN et al. (1970) ermittelten FUJITA et al. (1976a) Thiole als reaktivste nucleophile Substrate für die *Isodon*-Kaurane.

In biomimetischen Versuchen mit Cystein konnte dieser Befund an den *Pleurotellus*-Antibiotika bestätigt werden. Es wurde weiterhin gezeigt, daß die α-Methylen-ketone wesentlich schneller mit Cystein reagieren als die getesteten einfachen α-Methylen-γ-lactone. Darauf kann unter anderem ihre stärkere antibakterielle und Antitumor-Wirkung zurückgeführt werden (Tabelle 15 und 16). Zu gleichen Ergebnissen kamen LEE et al. (1971) mit Encelin und Farinosin, die bei vergleichsweise kleinen Konzentrationen stärker cytotoxisch wirkten als α-Methylen-γ- lactone.

Im Vergleichstest gegen nicht-transformierte und Simian-Virus 40 transformierte Fibroblasten hemmten Encelin und Farinosin beide Zelltypen gleichermaßen (LEE et al., 1971). Dies stimmt mit den Beobachtungen an den drei *Pleurotellus*-Antibiotika überein (Tabelle 7).

Auch Helenalin, für dessen Wirkung der zusätzliche Cyclopentenon-Ring neben der α-Methylen-γ-lacton-Gruppierung verantwortlich gemacht wird (LEE et al., 1974), hemmte in dem oben erwähnten Test (LEE et al., 1971) die Virus-transformierten Zellen nicht bevorzugt. Es ist jedoch als spezifischer Inhibitor einiger anderer Tumor-Formen bekannt geworden (HALL et al., 1978).

Die im Vergleich zu K-24375/1 und K-24375/3 wesentlich schwächere cytotoxische Wirkung von K-24375/2 kann zur Zeit noch nicht erklärt werden. An den α-Methylen-ketonen aus *Isodon* wiesen FUJITA et al. (1976 b) nach, daß das Ausmaß der Hemmung sehr stark mit der Einführung zusätzlicher Hydroxyl- oder Methyl-Gruppen benachbart zum Cyclopentanon-Ring variiert.

Alle bisher bekannt gewordenen Verbindungen mit α-Methylenketon-Gruppierung sind sowohl antibakteriell als auch cytotoxisch wirksam. Ihre Hemmwirkung wird allgemein auf die Alkylierung und damit Inaktivierung essentieller SH-Gruppen von Enzymen zurückgeführt (FUJITA et NAGAO, 1977). Die kovalente Bindung des Hemmstoffs erfolgt über die exocyclische Methylengruppe.

Die Enzyminaktivierung konnte mit K-24375/3 exemplarisch an der Alkohol-Dehydrogenase aus Hefe nachgewiesen werden (Tabelle 17). Ähnliche Ergebnisse liegen von LILLEHAUG et al. (1973) über die in vitro Hemmung der DNA-abhängigen RNA-Polymerase von *Escherichia coli* durch das α,β -ungesättigte Keton Jatrophon vor.

Genauere vergleichende Untersuchungen mehrerer Zellfunktionen zeigten, daß die Hemmwirkung von Helenalin auf ganze Zellen insgesamt als multipler Effekt aufgefaßt werden muß, die DNA-Synthese jedoch den sensitivsten Angriffspunkt darstellt (LEE et al., 1977).

Dies stimmt mit den Beobachtungen an Sarkomycin (SUNG, 1967) und mit der deutlichen Hemmung der Nucleinsäure-Synthesen durch die *Pleurotellus*-Antibiotika überein. Hierfür spricht auch ihre mutagene Wirkung im Ames-Test (Tabelle 11).

HALL et al. (1977) konnten die Hemmwirkung von Helenalin und Tenulin in Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms auf eine direkte Alkylierung nukleärer DNA-Polymerasen zurückführen. NMR-Studien zeigten, daß die Basen der DNA-Matrize nicht alkyliert wurden.

4.5. SICCAYNE AUS HALOCYPHINA VILLOSA

Halocyphina villosa, 1965 als mariner Deuteromycet beschrieben, wurde 1977 von GINNS et MALLOCH als cyphelloider Basidiomycet erkannt und entsprechend umgruppiert. Neben *Nia vibrissa* Moore et Meyers und *Digitatispora marina* Doguet ist *Halocyphina villosa* der dritte bislang bekanntgewordene Basidiomycet mariner Herkunft (KOHLMEYER et KOHLMEYER, 1979). Er wächst untergetaucht an abgestorbenen Teilen von *Rhizophora* Species und anderen Substraten.

Die von Professor OBERWINKLER in Kolumbien gesammelten Pilze konnten auf Medium drei ohne weiteren NaCl-Zusatz in Kultur gebracht und auch submers angezogen werden. Nach dreiwöchiger Fermentation bildet der Stamm relativ große Mengen (25 mg/l) der nur sehr schwach antibakteriellen Substanz Siccayne.

Siccayne wurde 1968 als antibiotisch aktiver Metabolit aus dem Deuteromyceten *Helminthosporium siccans* beschrieben (ISHIBASHI et al., 1968). Außer der Angabe, daß die Acetylen-Verbindung *Piricularia oryzae* und *Staphylococcus* hemmt, sind keine weiteren Untersuchungen über seine Wirkung aufgeführt.

Siccayne selbst ist bisher aus Basidiomyceten-Kulturen nicht bekannt geworden, verwandte Verbindungen sind zwei Antibiotika aus *Stereum frustulosum* Fr., Frustulosin und Frustulosinol (NAIR et ANCHEL, 1975, 1977). Sie unterscheiden sich von Siccayne nur durch eine Aldehyd- bzw. $-CH_2OH$-Gruppe am substituierten Benzol α-ständig zur Isopentenin-Seitenkette. Frustulosin, Frustulosinol sowie das Chinon-Derivat von Fru-

stulosinol sind antibakteriell wirksam (16 µg/ml gegen *Staphylococcus aureus* und *Bacillus*-Arten).

Siccayne hemmt Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms erst bei relativ hohen Konzentrationen (zwischen 25 - 50 µg/ml), transformierte und nicht-transformierte Hühnerembryo-Fibroblasten bereits mit 10 µg/5 ml. Wie Crinipellin reduziert es den Einbau der Vorstufen in Makromoleküle durch Interferenz mit deren Aufnahme (Tabelle 8). Zusätzlich wurde jedoch auch eine deutliche Hemmung der in vitro RNA- und DNA-Synthesen (Tabelle 9 und 10) festgestellt.

Eventuell können diese unterschiedlichen Effekte auf dem Einfluß verschiedener funktioneller Gruppen des Moleküls beruhen. Analog zu der bekannten detergentienartigen Wirkung von Phenolen (GALE et al., 1972) ist der Hydrochinon-Teil unter Umständen für eine Zerstörung der Membranintegrität der Zellen verantwortlich zu machen. Dies würde die Hemmung des Transports der Vorstufen erklären.

Die zweite funktionelle Gruppe, deren biologische Aktivität an anderen Molekülen untersucht wurde, ist die Acetylen-Gruppierung (TOWERS et WAT, 1978). Synthetische Acetylene erwiesen sich als Enzym-Hemmstoffe, die unter Öffnung der Dreifachbindung kovalent an Enzyme binden und sie dadurch inaktivieren (HERVEY et al., 1973; WALSH et al., 1972). Auf einem solchen Effekt könnte die Hemmung der DNA- und RNA-polymerisierenden Enzyme durch Siccayne beruhen.

4.6. SCORODONIN AUS MARASMIUS SCORODONIUS

Von den in Kultur genommenen und auf biologische Aktivität untersuchten *Marasmius*-Stämmen hemmte nur *Marasmius scorodonius* das Wachstum der Testorganismen.

Die aus dem Kulturfiltrat des Pilzes isolierte ölige Substanz konnte als neue Acetylenverbindung identifiziert werden und er-

hielt den Namen Scorodonin. Während die Allen-Struktur benachbart zu einer Dreifachbindung auch bei anderen Polyacetylenen aus Basidiomyceten vorkommt (JONES et THALLER, 1973), ist der Chlor-Substituent sehr ungewöhnlich. Halogenierte Acetylene sind vor allem aus marinen Organismen isoliert worden (FAULKNER, 1977).

Scorodonin hemmt das Wachstum Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien sowie das einiger Pilze. In Zellen des Ehrlich Ascites Carcinoms wirkt es vor allem auf die DNA-Synthese, bei *Bacillus brevis* und *subtilis* auf die RNA-Synthese. In vitro konnte ein deutlicher Effekt auf die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* festgestellt werden (Tabelle 14). In Übereinstimmung mit den Einbau-Versuchen in ganze Zellen war auch in vitro die DNA-Synthese von *Bacillus brevis* nicht hemmbar (Tabelle 10).

Wie bereits für Siccayne diskutiert, kann die Hemmwirkung von Scorodonin ebenfalls auf einer kovalenten Bindung an Enzyme beruhen. Weiterführende Untersuchungen zur Wirkungsweise des Antibiotikums werden allerdings durch seine erhebliche Instabilität erschwert.

4.7. SCREENING UND ANTIBIOTIKAPRODUKTION

In der vorliegenden Arbeit wurden cyphelloide Basidiomyceten und eventuell mit ihnen verwandte Arten der Tricholomataceen und Crepidotaceen untersucht. 25 Arten (≙ 40 Stämme) wurden isoliert und auf die Bildung antibiotisch aktiver Metabolite getestet. Acht Arten (≙ 19 Stämme) zeigten während des Screenings antibakterielle und zum Teil antifungische Aktivität und wurden näher untersucht.

Die Verteilung antibiotisch aktiver Stämme in den verschiedenen Gattungen läßt keine Regelmäßigkeit erkennen. Antibiotika-Produzenten scheinen unter cyphelloiden Formen nicht häufiger aufzutreten als unter agaricalen Pilzen. Immer wenn mehrere

Arten einer Gattung isoliert wurden, fanden sich neben Antibiotika produzierenden auch inaktive Arten.

In zwei Arten konnte das Vorkommen von Strobilurin A und Marasin bestätigt werden. Aus den restlichen sechs Arten wurden acht Reinsubstanzen, kristallin oder als homogene Öle, isoliert. Zwei der acht Substanzen haben eine bereits bekannte Struktur, die jedoch nicht von der gleichen Art bzw. aus Basidiomyceten bekannt war. Die weiteren sechs Antibiotika sind neue Verbindungen, von denen eine - Scorodonin - in ihrer Struktur vollständig aufgeklärt ist.

Immer wenn mehrere Stämme einer Art zur Verfügung standen, konnte das Vorkommen des jeweiligen Antibiotikums in allen Stämmen nachgewiesen werden. Das Merkmal der Antibiotika-Produktion scheint somit für die untersuchten Basidiomyceten als zusätzliches Art-Kennzeichen verwendbar zu sein. Weitere Rückschlüsse auf Verwandtschaften der cyphelloiden Sippen untereinander bzw. mögliche Anschlüsse an agaricale Gruppen sind aus den vorliegenden Daten nicht zu ziehen. Selbst die morphologisch nah verwandten Gattungen *Lachnella* und *Flagelloscypha* zeigen keine Übereinstimmung in der Bildung ihrer antibiotisch aktiven Sekundärmetabolite. Bevor jedoch die isolierten Antibiotika allgemeiner chemotaxonomisch bewertet werden können, müssen - verglichen mit den untersuchten Stämmen - wesentlich mehr Stämme der in Frage kommenden Gruppen in Kultur genommen und entsprechend untersucht werden.

Das Screening unserer Basidiomyceten erfolgte mit Hilfe des konventionellen Agardiffusionstests gegen Bakterien und Pilze. Neben der Erstellung von Wirkungsspektren stand bei der Untersuchung der Reinsubstanzen ihre Wirkung auf eukaryonte- und insbesondere Tumorzellen im Vordergrund. Von den meisten Tumor-Inhibitoren ist bekannt, daß sie entweder in die Nucleinsäuresynthesen oder an der Cytoplasma-Membran angreifen (UMEZAWA, 1979). Beide Wirkorte haben Pro- und Eukaryonten im wesentlichen gemeinsam. Klinisch erprobte Antitumor-Substanzen - wie zum Beispiel Adriamycin - sind oftmals gleichzeitig antibakteriell wirksam (UMEZAWA, 1979). Es erscheint daher durchaus sinnvoll, zunächst auf antibakterielle Aktivität zu screenen,

die Reinsubstanzen dann aber auch auf ihren tumorhemmenden Effekt genauer zu überprüfen. Die Kulturen können später, sofern spezielle Metabolite gesucht werden, unter einem engeren Aspekt und nach einem anderen Sreeningmodell nochmals getestet werden.

Die Mehrzahl der isolierten Substanzen gehört zur Gruppe der Terpene. Diese auffällige Häufung von Substanzen einer biogenetischen Herkunft kann die verschiedensten Ursachen haben und ist hier nicht zu klären. Eine große Rolle spielt sicherlich das übermäßige Kohlenhydrat-Angebot der verwendeten Medien. Ein weiterer Aspekt ist jedoch bemerkenswert: Abgesehen von *Flagelloscypha pilatii* sind die anderen Terpen-Antibiotika-produzierenden Arten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, Holzbewohner. Sehr ähnliche Verbindungen wie die isolierten Hemmstoffe - oder wie im Fall der Marasminsäure die identische Substanz - werden von Pilzen gebildet, die gleichfalls Holz besiedeln und abbauen.

Das Vorkommen ähnlicher Sekundär-Metabolite in Kulturen dieser Pilze spricht für Gemeinsamkeiten in der Ausstattung an Enzymen und könnte durchaus mit ihrer Eigenschaft, dasselbe Substrat zu besiedeln und zu verwerten, in Verbindung gebracht werden. Chemotaxonomische Folgerungen aus der Verbreitung solcher Substanzen bei verschiedenen Pilzgruppen wären dann nur noch sehr eingeschränkt möglich.

5. ZUSAMMENFASSUNG

40 Stämme (≙ 25 Arten) von Basidiomyceten mit vorwiegend cyphelloidem Fruchtkörperbauplan sowie einige agaricale Vertreter wurden in Kultur genommen und auf die Bildung antibiotisch aktiver Substanzen untersucht.

Aus Submerskulturen von sechs Arten konnten acht lipophile Antibiotika isoliert werden. Zwei der acht Antibiotika wurden als bereits aus anderen Pilzen bekannte Verbindungen identifiziert, die restlichen sechs sind Sekundärmetabolite mit neuer Struktur.

Für alle Antibiotika wurden Wirkungsspektren erstellt sowie ihre Hemmwirkung auf die Makromolekülsynthesen pro- und eukaryontischer Testorganismen in vivo und in vitro untersucht.

Die antibiotische Wirkung des Diterpens Crinipellin - $C_{22}H_{28}O_5$ - aus *Crinipellis stipitaria* kann aller Wahrscheinlichkeit nach auf eine Interferenz mit der Cytoplasma-Membran zurückgeführt werden. Die partielle Desorganisation des Membrangefüges bietet eine Erklärung für die beobachtete Hemmung mehrerer Transportsysteme, unter denen der Nucleosid-Transport am stärksten betroffen ist. Die Kinasen der auf den Uridin-Transport folgenden Phosphorylierung werden nicht spezifisch gehemmt. Im direkten Vergleich Rous-Sarcoma-Virus-transformierter und nichttransformierter Hühnerembryo-Fibroblasten wirkte Crinipellin bevorzugt auf den Virus-transformierten Zell-Typ.

Aus *Flagelloscypha pilatii* wurde K-322 isoliert. Das Sesquiterpen - $C_{15}H_{16}O_5$ - ist über eine Esterbindung mit C_6- und C_7-Carbonsäuren verknüpft. K-322 hemmt bei Pro- und Eukaryonten bevorzugt die Nucleinsäuresynthesen, in vitro konnte ein Effekt auf die DNA-Synthese nachgewiesen werden. Ähnlichkeiten im Wirkungsmechanismus zu Mimosin werden diskutiert.

Marasminsäure, ein Sesquiterpen mit breitem Wirkungsspektrum aus *Marasmius conigenus*, wurde aus Submerskulturen einer tropischen *Lachnella*-Art isoliert. Das Antibiotikum hemmt Grampositive und Gram-negative Bakterien sowie eine Reihe zum Teil

phytopathogener Pilze bei sehr niedrigen Konzentrationen. In Zellkulturen entfaltet es eine unspezifische cytotoxische Wirkung. Die in vivo beobachtete Hemmung der Nucleinsäure-Synthesen konnte in vitro bestätigt werden. Methyl-Marasmat ist nicht wesentlich schwächer wirksam als Marasminsäure und erwies sich im Ames-Test gleichfalls als mutagen. Die antibiotische Aktivität ist mit der reaktionsfähigen Aldehyd-Gruppe in Verbindung zu bringen, da das reduzierte Lacton-Derivat der Marasminsäure keine Hemmwirkung mehr zeigt.

Aus *Pleurotellus hypnophilus* konnten drei Sesquiterpene mit α-Methylen-keton-Gruppierung - K-24375/1-3 - isoliert werden. K-24375/1 hat ein Hirsutan-Grundgerüst und ist der Complicatsäure sehr ähnlich. Alle drei Verbindungen sind vermutlich als Enzym-Inhibitoren einzustufen, die über die exocyclische Methylengruppe an SH-Gruppen addieren. Die Inaktivierung durch Cystein und die Hemmwirkung auf ein exemplarisches SH-Enzym stützen diese Vermutung. In ganzen Zellen erwiesen sich die Nucleinsäure-Synthesen als sensitivster Angriffsort. K-24375/2 unterscheidet sich von K-24375/1 und K-24375/3 durch seine wesentlich schwächere antibiotische Aktivität und durch seine abweichende Wirkung auf Ehrlich Ascites Zellen. Die Befunde an den drei Hemmstoffen aus *Pleurotellus* werden mit anderen α-Methylen-keton- (und -lacton-)Verbindungen verglichen.

Halocyphina villosa, ein cyphelloider Pilz mariner Herkunft, produziert Siccayne, ein aus *Helminthosporium siccans* bekanntes Hydrochinon mit Isopentenin-Seitenkette. Die Substanz hat nur sehr schwache antibiotische Wirkungen und hemmt unter Eukaryonten Fibroblasten wesentlich stärker als Ehrlich Ascites Zellen. Siccayne interferiert mit der Aufnahme von Vorstufen in ganze Zellen, aber auch mit der DNA- und RNA-Synthese in vitro. Die reaktionsfähigen Gruppen des Moleküls und ihr gegebenenfalls multipler Effekt werden diskutiert.

Scorodonin ist eine neue, chlorierte Acetylen-Verbindung aus *Marasmius scorodonius*. Das Antibiotikum hemmt Bakterien und Pilze aufgrund seiner Instabilität nur über kürzere Zeiträume. In Ehrlich Ascites Zellen greift Scorodonin bevorzugt die DNA-

Synthese an, bei *Bacillus* die RNA-Synthese. In vitro konnte ein Effekt auf die DNA-abhängige RNA-Polymerase aus *Escherichia coli* festgestellt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

AGERER, R.: Rectipilus. Eine neue Gattung cyphelloider Pilze. Persoonia 7, 389-436 (1973)

AGERER, R.: Flagelloscypha. Studien an cyphelloiden Basidiomyceten. Sydowia 27, 131-265 (1975)

AGERER, R.: Lachnella-Crinipellis, Stigmatolemma-Fistulina: Zwei Verwandtschaftsreihen? Z. Mykol. 44, 51-70 (1978)

AGERER, R.: Flagelloscypha sect. Lachnelloscypha. A link between the genera Lachnella and Flagelloscypha. Persoonia 10, 337-346 (1979)

AGERER, R., F. OBERWINKLER: Cyphelloide Tremellaceen. Beihefte zur Sydowia, Annales Mykologici, Ser. II, Beiheft VIII, 26-32 (1979)

AHMED, N.K., A.D. WELCH: Some properties of uridine-cytidine kinase from a human malignant lymphoma. Cancer Res. 39, 3102-3106 (1979)

ALLBUTT, A.D., W.A. AYER, H.J. BRODIE, B.N. JOHRI, H. TAUBE: Cyathin, a new antibiotic complex produces by Cyathus helenae. Can. J. Microbiol. 17, 1401-1407 (1971)

AMES, B.N., J. McCANN, E. YAMASAKI: Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/Mammalian-microsome mutagenicity test. Mut. Res. 31, 347-364 (1975)

ANKE, T.: Antibiotika aus Basidiomyceten. Z. Mykol. 44, 129-139 (1978)

ANKE, T., F. OBERWINKLER, W. STEGLICH, G. HÖFLE: The striatins - new antibiotics from the basidiomycete Cyathus striatus (Huds. ex Pers.) Willd. J. Antibiotics 30, 221-225 (1977)

ANKE, T., H.J. HECHT, G. SCHRAMM, W. STEGLICH: Antibiotics from Basidiomycetes IX. Oudemansin, an antifungal antibiotic from Oudemansiella mucida (Schrader ex Fr.) Hoehnel (Agaricales). J. Antibiotics 32, 1112-1117 (1979)

ANKE, T., J. KUPKA, G. SCHRAMM, W. STEGLICH: Antibiotics from Basidiomycetes X. Scorodonin, a new antibacterial and antifungal metabolite from Marasmius scorodonius. In Vorbereitung (1980)

ASAHI, K., J. NAGATSU, S. SUZUKI: Xanthocidin, a new antibiotic. J. Antibiotics 19, 195-199 (1966)

ASAHI, K., S. SUZUKI: Structure of xanthocidin. Agr. Biol. Chem. 34, 325-326 (1970)

ASAKAWA, Y., M. TOYOTA, T. TAKEMOTO: New diterpenes from Porella perottetiana. Phytochem. 18, 1681-1685 (1979)

AURICCHIO, F., C.B. BRUNI: The role of essential - SH groups of yeast alcohol dehydrogenase.
Biochim. Biophys. Acta, 185, 461-463 (1969)

AYER, W.A., H. TAUBE: Metabolites of Cyathus helenae. Cyathin A_3 and allocyathin B_3, members of a new group of diterpenoids.
Tetrahedron Letters 19, 1917-1920 (1972)

AYER, W.A., L.L. CARSTENS: Diterpenoid metabolites of Cyathus helenae. Cyathin B_3 and cyatin C_3.
Can. J. Chem. 51, 3157-3160 (1973)

BÄUERLE, J.: Antibiotika aus der Gattung Mycena (Pers. ex Fr.) S.F. Gray und aus Hydropus scabripes (Murr.) Sing.
Diplomarbeit Universität Tübingen (1979)

BASHOR, M.M.: Dispersion and disruption of tissues. In: Methods in Enzymology, Vol. 58 Cell Culture Academic Press, New York (1979)

BAUTE, R., M. BAUTE, G. DEFFIEUX, M. FILLEAU: Cortalcerone A, a new antibiotic induced by external agents in Corticium caeruleum.
Phytochem. 15, 1753-1756 (1976)

BENDZ, G.: Marasin, an antibiotic polyacetylene, isolated from the culture of Marasmius ramealis.
Arkiv för Kemi 14, 305-321 (1959)

BERLIN, R.D., J.M. OLIVER: Membrane transport of purine and pyrimidine bases and nucleosides in animal cells.
Int. Rev. of Cytology 42, 287-336 (1975)

BISHOP, J.M.: Retroviruses.
Ann. Rev. Biochem. 47, 35-88 (1978)

BLUHM, U.: Untersuchungen zur Messung der RNA-Polymerase-Aktivität A und B an isolierten Zellkernen aus synchronen Zellpopulationen von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Diplomarbeit Universität Tübingen (1974)

BOHLMANN, F., K.H. KNOLL: Neuartige Sesquiterpenlactone und neue Acetylenverbindungen aus Athanasia-Arten.
Phytochem. 18, 995-1001 (1979)

BOHLMANN, F., P.K. MAHANTA: Zwei neue Pseudoguajanolide aus Telekia speciosa.
Phytochem. 18, 887-888 (1979)

BOHLMANN, F., C. ZDERO: Neue Germacranolide und andere Inhaltsstoffe aus Vertretern der Subtribus Gochnatiinae.
Phytochem. 18, 95-98 (1979)

BOHLMANN, F., P.K. MAHANTA, A. SUWITA, A. SUWITA, A.A. NATU, C. ZDERO, W. DORNER, D. EHLERS, M. GRENZ: Neue Sesquiterpenlactone und andere Inhaltsstoffe aus Vertretern der Eupatorium-Gruppe.
Phytochem. 16, 1973-1981 (1977)

BOHLMANN, F., P.K. MAHANTA, J. JAKUPOVIC, R.C. RASTOGI, A.A. NATU: New Sesquiterpene lactones from Inula species.
Phytochem. 17, 1165-1172 (1978)

BRAUNDRET, K.M., W. DALZIEL, B. HESP, J.A.J. JARBIS, S. NEIDLE: X-Ray cristallographic determination of the structure of the antibiotic aphidicolin: a tetracyclic diterpenoid containing a new ring system.
Chem. Comm., 1027-1028 (1972)

CHAMBON, P.: Eucaryotic nuclear RNA polymerase.
Ann. Rev. Biochem. 44, 613-638 (1975)

CHRISTENSEN, H.N., C. de CESPEDES, M.E. HANDLOGTEN, G. RONQUIST: Energization of amino acid transport, studied for the Ehrlich ascites tumor cell.
Biochem. Biophys. Acta 300, 487-522 (1973)

COCHET-MEILHAC, M., P. CHAMBON: Animal DNA dependent RNA polymerases. 11. Mechanism of the inhibition of RNA polymerases B by amatoxin.
Biochem. Biophys. Acta 353, 160-184 (1974)

COMER, F.W., F. McCAPRA, I.H. QUERESHI, A.I. SCOTT: The structure and chemistry of hirsutic acid.
Tetrahedron 23, 4761-4768 (1967)

COMER, F.W., F. McCAPRA, I.H. QUERESHI, J. TROTTER, A.I. SCOTT: The structure and stereochemistry of hirsutic acid C, a novel fungal sesquiterpene.
Chem. Comm. 1965, 310-311 (1965)

COOKE, W.B.: The cyphellaceous fungi. A study in the Porotheleaceae.
Beih. Sydowia 4, 1-144 (1961)

COZARELLI, N.R.: The mechanism of action of inhibitors of DNA-synthesis.
Ann. Rev. Biochem. 46, 641-668 (1977)

CRADWIEN, P.D., G.A. SIM: Crystallographic determination of partial stereochemistries of the sesquiterpenoids illudol and marasmic acid.
Chem. Comm. 1971, 431-432 (1971)

DEML, G., T. ANKE, F. OBERWINKLER, B.M. GIANNETTI, W. STEGLICH: Schizonellin A and B, new glycolipids from Schizonella melanogramma.
Phytochem. 19, 83-87 (1980)

DONK, M.A.: Notes on Cyphellaceae. I.
Persoonia 1, 25-110 (1959)

DREWS, J., A. GEORGOPOULOS, G. LABER, E. SCHÜTZE, J. UNGER: Antimicrobial activities of 81.723 hfu, a new pleuromutilin derivative.
Antimicr. Agents Chemoth. 7, 507-516 (1975)

DUGAN, J.J., P. de MAYO, M. NISBET, J.R. ROBINSON, M. ANCHEL: Terpenoids XIV. The constitution and biogenesis of marasmic acid.
J. Am. Chem. Soc. 88, 2838-2844 (1966)

ESTABROOK, R.W.: Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O ratios. In: Methods in Enzymology Vol. 10, New York (1967)

FAULKNER, D.J.: Interesting aspects of marine natural products chemistry.
Tetrahedron 33, 1421-1443 (1977)

FLOREY, H.W., E. CHAIN, N.G. HEATLEY, M.A. JENNINGS, A.G. SANDERS, E.P. ABRAHAM, M.E. FLOREY: Antibiotics Vol. 1, 248-272, London Oxford University Press (1949)

FRIDLAND, A., P.G. SCHOLEFIELD: Nucleotide metabolism in Ehrlich Ascites carcinoma cells.
Biochem. Biophys. Acta 182, 295-306 (1969)

FROMMER, W., B. JUNGE, L. MÜLLER, D. SCHMIDT, E. TRUSCHEIT: New enzyme inhibitors form microorganisms.
Planta Medica 35, 195-217 (1979)

FUCHS, E., R.L. MILLETTE, W. ZILLIG, G. WALTER: Influence of salts on RNA synthesis by DNA-dependent RNA-polymerase from Escherichia coli.
Eur. J. Biochem. 3, 183-193 (1967)

FUJITA, E., T. FUJITA, H. KATAYAMA, M. SHIBUYA, T. SHINGU: Terpenoids. Part XV. Structure and absolute configuration of oridonin isolated from Isodon japonicus and Isodon trichocarpus.
J. Chem. Soc. (C), 1674-1681 (1970)

FUJITA, E., M. TAOKA: Terpenoids XX. The structure and absolute configuration of lasiokaurin and lasiodonin, new diterpenoids from Isodon lasiocarpus (Hayata) Kudo.
Chem. Pharm. Bull. 20, 1752-1754 (1972)

FUJITA, E., Y. NAGAO, K. KANEKO, S. NAKAZAWA, H. KURODA: The antitumor and antibacterial activity of the Isodon diterpenoids.
Chem. Pharm. Bull. 24, 2118-2127 (1976a)

FUJITA, E., Y. NAGAO, M. NODE, K. KANEKO, S. NAKAZAWA, H. KURODA: Antitumor activity of the Isodon diterpenoids: Structural requirements for the activity.
Experientia 32, 203-206 (1976b)

FUJITA, E., Y. NAGAO: Tumor inhibitors having potential for interaction with mercapto enzymes and/or coenzymes. A review.
Bioorg. Chem. 6, 287-309 (1977)

FUJITA, T., Y. TAKEDA, T. SHINGU: Bitter diterpenoids from Isodon shikokianus var. intermedius.
Phytochem. 18, 299-301 (1979)

GALE, E.F., E. CUNDLIFFE, P.E. REYNOLDS, M.H. RICHMOND, M.J. WARING: The molecular basis of antibiotic action.
London-New York, John Wiley et sons (1972)

GEISSMANN, T.A., R. MUKHERJEE: Sesquiterpene lactones of Encelia farinosa Gray.
J. Org. Chem. 33, 656-660 (1968)

Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (Hrsg.): Wissenschaftlicher Ergebnisbericht 1978

GIANNETTI, B.M., W. STEGLICH, W. QUACK, T. ANKE, F. OBERWINKLER: Antibiotics from basidiomycetes. VI. Merulinic acids A, B, and C, new antibiotics from Merulius tremellosus and Phlebia radiata.
Z. Naturforsch. C.: Biosci. 33 C, 807-816 (1978)

GINNS, J., D. MALLOCH: Halocyphina, a marine basidiomycete (Aphyllophorales).
Mycologia 69, 53-58 (1977)

GREENLOE, W.J., R.B. WOODWARD: Total synthesis of marasmic acid.
J. Am. Chem. Soc. 98, 6075-6076 (1976)

GUIDOTTI, G.G., A.F. BORGHETTI, G.C. CAZZOLA: The regulation of amino acid transport in animal cells.
Biochem. Biophys. Acta 515, 329-366 (1978)

HALL, I.H., K.-H. LEE, E.-C. MAR, C.O. STARNES, T.G. WEDELL: Antitumor agents 21. A proposed mechanism for inhibition of cancer growth by tenulin and helenalin and related cyclopentenones.
J. Med. Chem. 20, 333-337 (1977)

HALL, I.H., K.H. LEE, S.A. EIGEBALY: Antitumor Agents XXVII: Effect of helenalin on anaerobic and aerobic metabolism of Ehrlich Ascites cells.
J. Pharm. Sci. 67, 552-554 (1978)

HANEJSHI, T., N. KITAHARA, Y. TAKIGUCHI, M. ARAI, M. ARAI, S. SUGAWARA: New antibiotics, methylenomycins A and B. I. Producing organism, fermentation and isolation, biological activities, and physical and chemical properties.
J. Antibiotics 27, 386-392 (1974a)

HANEJSHI, T., A. TERAHARA, M. ARAI, T. HATA, C. TAMURA: New antibiotics, methylenomycins A and B. II. Structures of methylenomycins A and B.
J. Antibiotics 27, 393-399 (1974b)

HANEJSHI, T., A. TERAHARA, K. HAMANO, M. ARAI: New antibiotics, methylenomycins A and B. III. Chemical modification of methylenomycin A and structure activity correlations in methylenomycins.
J. Antibiotics 27, 400-407 (1974)

HANSEN, R.L., H.A. LARDY, S.M. KUPCHAN: Inhibition of phosphofructokinase by quinone methide and α-methylene lactone tumor inhibitors.
Science 168, 378-380 (1970)

HECHT, H.J., G. HÖFLE, W. STEGLICH, T. ANKE, F. OBERWINKLER: Striatin A, B and C: Novel diterpenoid antibiotics from Cyathus striatus; X-ray crystal structure of striatin A.
Chem. Comm. 1978, 665-666 (1978)

HERVEY, A.H.: A survey of 500 basidiomycetes for antibacterial activity.
Bull. Torrey Bot. Club 74, 476-503 (1947)

HERZ, W., P.S. SUBRAMANIAM, T.A. GEISSMAN: 3-epiisotelekin from Gaillardia aristata Pursh. and the structure of farinosin.
J. Org. Chem. 33, 3743-3749 (1968)

HEVEY, R.C., J. BABSON, A.L. MAYCOCK, R.H. ABELES: Highly specific enzyme inhibitors. Inhibition of plasma amine oxidase.
J. Am. Chem. Soc. 95, 6125-6127 (1973)

HIGASHINAKAGAWA, T., T. ONISHI, M. MURAMATSU: A factor stimulating the transscription by nucleolar RNA-polymerase in the nucleolus of rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Com. 48, 937-944 (1972

HODGIN, L.A., G. HÖGENAUER: The mode of action of pleuromutilin derivatives.
Eur. J. Biochem. 47, 527-533 (1974)

HÖGENAUER, G.: Tiamulin and pleuromutilin. In: Antibiotics. V-1. Mechanism of action of antibacterial agents, 344-360 Springer, Heidelberg (1979)

HORAK, E.: Synopsis generum Agaricalium (Die Gattungstypen der Agaricales).
Beitr. Kryptogamenflora Schweiz Bd. 13, Bern (1968)

HUNTER, E.: Biological techniques for avian sarcoma viruses. In: Methods in enzymology, Vol. 58, Academic Press New York (1979)

HYNES, R.O.: Cell surface proteins and malignant transformation.
Biochem. Biophys. Acta 458, 72-107 (1976)

IKEGAMI, S., T. TAGUCHI, M. OHASHI, M. OGURA, H. NAGANO, Y. MANO: Aphidocolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA-polymerase α .
Nature 275, 458-460 (1978)

ISHIBASHI, K., K. NOSE, T. SHINDO, M. ARAI, H. MISHIMA: Siccayne: A novel acetylenic metabolite of Helminthosporium siccans.
Ann. Sankyo Res. Lab. 20, 76-79 (1968)

ISHIZUKA, M., J. IINUMA, T. TAKEUCHI, H. UMEZAWA: Effect of diketocoriolin B on antibody formation.
J. Antibiotics 25, 320-321 (1972)

JOHNSON, D., H. LARDY: Isolation of liver or kidney mitochondria. In: Estabrook, R.W., M.E. Pullman: Methods in Enzymology, Vol. X, pp 94-96, Academic Press, London and New York (1967)

JONES, E., V. THALLER: Microbial poly-ines. In: Laskin, A.I., H.A. Lechevalier (Hrsg.): Handbook of microbiology, Vol. III. Microbial products. CRC-Press, Cleveland (1973)

KAVANAGH, F., A. HERVEY, W.J. ROBBINS: Antibiotic substances from basidiomycetes. IV. Marasmius conigenus.
Proc. Nat. Acad. Sci. 35, 343-349 (1949)

KAVANAGH, F., A. HERVEY, W.J. ROBBINS: Antibiotic substances from basidiomycetes VIII. Pleurotus mutilis and Pleurotus passeckerianus.
Proc. Nat. Acad. Sci 37, 570-574 (1951)

KAVANAGH, F.: Analytical microbiology. Vol. I.
New York (1963)

KAWAI, S., H. HANAFUSA: The effects of reciprocal changes in temperature on the transformed state of cells infected with a Rous sarcoma virus mutant.
Virology 46, 470-479 (1971)

KIRST, G.: Untersuchungen zur Hemmung der Zygosporenbildung bei Mucor hiemalis.
Dissertation Universität Tübingen (1971)

KOHLMEYER, J., E. KOHLMEYER: Marine mycology. The Higher fungi.
Academic Press, New York (1979)

KRYSTAL, K., P.G. SCHOLEFIED: The partial purification and properties of uridine kinase from Ehrlich ascites tumor cells.
Can. J. Biochem. 51, 379-389 (1973)

KUNOMOTO, T., M. HORI, H. UMEZAWA: Mechanism of action of diketocoriolin B.
Biochim. Biophys. Acta. 298, 513-525 (1973)

KUPCHAN, S.M., D.C. FESSLER, M.A. EAKIN, T.J. GIACOBBE: Reaction of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles.
Science 168, 376-377 (1970)

KUPCHAN, S.M., M.A. EAKIN, A.M. THOMAS: Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones.
J. Med. Chem. 14, 1147-1152 (1971)

KUPKA, J.: Isolierung und Charakterisierung eines Antibiotikums aus Crinipellis stipitaria (Fr.) Pat.
Diplomarbeit Tübingen (1978)

KUPKA, J., T. ANKE, F. OBERWINKLER, G. SCHRAMM, W. STEGLICH: Antibiotics from basidiomycetes VII. Crinipellin, a new antibiotic from the basidiomycetous fungus Crinipellis stipitaria (Fr.) Pat.
J. Antibiotics 32, 130-135 (1979)

LEE, K.-H., E.-S. HUANG, C. PIANTADOSI, J.S. PAGANO, T.A. GEISSMAN: Cytotoxicity of sesquiterpene lactones.
Cancer Res. 31, 1649-1654 (1971)

LEE, K.-H., T. IBUKA, R.-Y. WU: Beta unsubstituted cyclopentenone, a structural requirement for antimicrobial and cytotoxic activities.
Chem. Pharm. Bull. 22, 2206-2208 (1974)

LEE, K.-H., I.H. HALL, E.-C. MAR, C.O. STARNES, S.A. ELGEBALY, T.G. WADDELL, R.I. HADGRAFT, C.G. RUFFNER, I. WEIDNER: Sesquiterpene antitumor agents: Inhibitors of cellular metabolism.
Science 196, 533-536 (1977)

LEHNINGER, A.: Biochemie.
Verlag Chemie, Weinheim-New York (1977)

LESSLER, M.A., G.P. BRIERLEY: Oxygen electrode measurement in biochemical analysis. In: Glick, D. (Hrsg.): Methods of biochemical analysis, Vol. 17, Interscience Publishers, New York (1969)

LILLEHAUG, J.R., K. KLEPPE, C.W. SIGEL, S.M. KUPCHAN: Reaction of biological thiols with the tumor inhibitor jatrophone. Inhibition of RNA-polymerase.
Biochim. Biophys. Acta 327, 92-100 (1973)

LIST, P.H., H. HACKENBERG: Velleral und Isovelleral, scharf schmeckende Stoffe aus Lactarius vellereus Fr. 17. Mitteilung über Pilzinhaltsstoffe.
Arch. Pharm. 302, 125-143 (1969)

LISY, J.M., J. CLARDY, M. ANCHEL, S.M. WEINREB: X-ray structures of phlebiakauranol and phlebianorkauranol, highly oxygenated antibacterial metabolites of Phlebia strigosozonata.
Chem. Comm. 1975, 406-407 (1975)

MAGNUSSON, G., S. THOREN, B. WICKBERG: Fungal extractives I. Structure of a sesquiterpene dialdehyde from Lactarius by computer simulation of the nmr-spectrum.
Tetrahedron Letters , 1105-1108 (1972)

MANTLE, P.G., G. MELLOWS: Complicatic acid, a sesquiterpenoid antibiotic from Stereum complicatum.
J. Gen. Microbiol. 73, xxii (1972)

MARTIN, E.M., J. MALEC, S. SVED, T.S. WORK: Studies on protein and nucleic acid metabolism in virus-infected mammalian cells. 1. Encephalomyocarditis virus in Krebs II mouse ascites tumor cells.
Biochem. J. 80, 585-597 (1961)

MARUYAMA, I.N., H. SUZUKI, N. TANAKA: Mechanism of action of neothramycin. I. The effect on macromolecular syntheses.
J. Antibiotics 31, 761-768 (1978)

MATSUSHITA, T., H.E. KUBITSCHEK: DNA replication in bacteria.
In: Advances in microbial physiology 12, 247-327 (1975)

McCANN, J., N.E. SPINGARN, J. KOBORI, B.N. AMES: Detection of carcinogens as mutagens: Bacterial tester strain with R factor plasmids.
Proc. Nat. Acad. Sci USA 72, 979-983 (1975)

McCANN, J., B.N. AMES: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73, 950-954 (1976)

McMORRIS, T.C., M. ANCHEL: Fungal metabolites. The structures of the novel sesquiterpenoids illudin-S und -M.
J. Am. Chem. Soc. 87, 1594-1600 (1965)

MELLOWS, G.P., G. MANTLE, T.C. FELINE: Sesquiterpenoid metabolites from Stereum complicatum.
Phytochem. 12, 2717-2720 (1973)

MEISTER, A.: Biochemistry of the amino acids.
Academic Press, London and New York (1965)

MERCK, E.: Klinisches Labor, 12. Aufl. (1974)

MOSER, M.: Die Gattung Phlegmacium (Schleimköpfe). In: Die Pilze Mitteleuropas 4, 1-440, Julius Klinkhardt, Bad Heilbrunn 1960 (publ. 1961)

MOSER, M.: Die Röhrlinge und Blätterpilze (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales). Kleine Kryptogamenflora, Bd. 2, Pilze, Teil b, Basidiomyceten, Teil 2.
Fischer-Verlag, Stuttgart-New York (1978)

MOSES, R.E., C.C. RICHARDSON: Replication and repair of DNA in cells of Escherichia coli treated with toluene.
Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 674-681 (1970)

MURAMATSU, M., N. SHIMADA, T. HIGASHINAKAGAWA: Effect of cycloheximide on the nucleolar RNA synthesis in rat liver.
J. Mol. Biol. 53, 91-106 (1970)

MURAMATSU, M., Y. HAYASHI, T. ONISHI, M. SAKAI, K. TAKAI, T. KASHIYAMA: Rapid isolation of nucleoli from detergent purified nuclei of various tumor and tissue culture cells.
Experimental Cell Res. 88, 345-351 (1974)

NAIR, M.S.R., M. ANCHEL: Frustulosin, an antibiotic metabolite of Stereum frustulosum.
Tetrahedron Letters 31, 2641-2642 (1975)

NAIR, M.S.R., M. ANCHEL: Frustulosinol, an antibiotic metabolite of Stereum frustulosum: Revised structure of frustulosin.
Phytochem. 16, 390-392 (1977)

NAIR, M.S.R., A. HERVEY: Structure of lepiochlorin, an antibiotic metabolite of a fungus cultivated by ants.
Phytochem. 18, 326-327 (1979)

NAKANISHI, K., I. KUBO: Studies on warburganal, muzigadial and related compounds.
Isr. J. Chem. 16, 28-31 (1977)

NÜSSLEIN, V., A. KLEIN: DNA replication in the cellophane membrane system. In: Methods in molecular biology, Vol. 7 (A.I. Laskin, J.A. Last eds.), 163-179, Marcel Dekker Inc., New York (1975)

PEDRALI, G., S. SPADARI: Effect of aphidicolin on viral and human polymerases.
Biochem. Biophys. Res. Com. 88, 1194-1202 (1979)

PLAGEMANN, P.G.W., D.P. RICHEY: Transport of nucleosides, nucleic acid bases, choline and glucose by animal cells in culture.
Biochim. Biophys. Acta 344, 263-305 (1974)

PLAGEMANN, P.G.W., D.P. RICHEY, J.M. ZYLKA, J. ERBE: Cell cycle and growth stage dependent changes in the transport of nucleosides, hypoxanthine, choline and deoxyglucose in cultured Novikoff rat hepatoma cells.
J. Cell Biol. 64, 29-41 (1974)

PLAGEMANN, P.G.W., R. MARZ, R.N. WOHLHUETER: Uridine transport in Novikoff rat hepatoma cells and other cell lines and its relationships to uridine phosphorylation and phosphorolysis.
J. Cell Physiol. 97, 49-72 (1978)

PROBST, G.: Verschiebungen von DNA-Polymerase-Aktivität zwischen Kern und Plasma im Verlaufe des Zellzyklus von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen.
Dissertation Tübingen (1973)

PURCHIO, A.F., E. ERIKSON, J.S. BRUGGE, R.L. ERIKSON: Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus src gene.
Proc. Nat. Acad. Sci USA 75, 1567-1571 (1978)

QUACK, W.: Merulinsäuren A, B und C und Merulidial, neue Antibiotika aus Basidiomyceten.
Dissertation Universität Tübingen (1978)

REISSNER, A.H., C.A. BUCHOLTZ, K.A. WARD: Effects of the plant amino acid mimosine on cell division, DNA, RNA and protein syntheses in Paramecium.
Mol. Pharmacology 16, 278-286 (1979)

RINGEL, S.M.: In vitro and in vivo studies of ambruticin (W 7783): New class of antifungal antibiotics.
Antimicr. Agents Chemother. 13, 762-769 (1978)

RINGEL, S.M., R.C. GREENOUGH, S. ROEMER, D. CONNOR, A.L. GUTT, B. BLAIR, G. KANTER, M. von STRANDTMANN: Ambrucitin (W 7783), a new antifungal antibiotic.
J. Antibiotics 30, 371-375 (1977)

ROBBINS, P.W., G.G. WICKUS, P.E. BRANTAN, B.J. GAFFNEY, C.B. HIRSCHBERG, P. FUCHS, P.M. BLUMBERG: The chicken fibroblast cell surface after transformation by Rous sarcoma virus.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 39, 1173-1180 (1975)

RODRIGUEZ, E., G.H.N. TOWERS, J.C. MITCHELL: Biological activities of sesquiterpene lactones.
Phytochem. 15, 1573-1580 (1976)

ROHRSCHNEIDER, L.R.: Immunofluorescence on avian sarcoma virus-transformed cells: Localization of the src gene product.
Cell 16, 11-24 (1979)

SAITO, H., T. OHKI, N. TAKASUKA, T. SASAKI: A carbon 13 nmr spectral study of a gel forming branches 1-3 beta D-glucan lentinan from Lentinus edodes and its acid degraded fractions structure and dependence of conformation on the molecular weight.
Carbohydr. Res. 58, 293-305 (1977)

SARNGADHARAN, M.G., M. ROBERT-GUROFF, R.C. GALLO: DNA polymerases of normal and neoplastic mammalian cells.
Biochim. Biophys. Acta 516, 419-487 (1978)

SCHRAMM, G., W. STEGLICH, T. ANKE, F. OBERWINKLER: Antibiotika aus Basidiomyceten III. Strobilurin A und B, antifungische Stoffwechselprodukte aus Strobilurus tenacellus.
Chem. Ber. 111, 2779-2784 (1978)

SEFTON, B.M., T. HUNTER, K. BEEMON: Product of in vitro translation of the Rous sarcoma virus scr gene has protein kinase activity.
J. Virology 30, 311-318 (1979)

SEQUEIRA, L., R.J. HEMINGWAY, S.M. KUPCHAN: Vernolepin: A new, reversible plant growth inhibitor.
Science 161, 789-790 (1968)

SHINOZAWA, S., K. TSUTSUI, T. ODA: Enhancement of the antitumor effect of illudin S by including it into liposomes. Experientia 35, 1102-1103 (1979)

SINGER, R.: A monographic study of the genera "Crinipellis" and "Chaetocalathus". Lilloa 8, 441-534 (1942)

SINGER, R.: The Agaricales (Tricholomataceae). Lilloa 22, (1951)

SINGER, R.: The Agaricales in modern taxonomy. J. Cramer, Vaduz (1975)

SPRING, O.: Isolierung, Charakterisierung und Wirkung von Wachstumshemmstoffen aus Helianthus annuus. Diplomarbeit Universität Tübingen (1980)

SUNDQUIST, K.G., P. OTTESKOG: Cytochalasin B induces polarisation of plasma membrane components and actin in transformed cells. Nature 274, 915-917 (1978)

SUNG, S.: Sarkomycin. In: Antibiotics. I. Mechanisms of action, 156-165, Springer, Heidelberg (1967)

TAKAHASHI, S., H. IINUMA, T. TAKITA, K. MAEDA, H. UMEZAWA: The structure of coriolin, a new sesquiterpene antibiotic. Tetrahedron Letters 1969, 4663-4666 (1969)

TAKAHASHI, S., H. NAGANAWA, H. IINUMA, T. TAKITA, K. MAEDA, H. UMEZAWA: Revised structure and stereochemistry of coriolins. Tetrahedron Letters 1971, 1955-1958 (1971)

TEITEI, T., R.L.N. HARRIS: Tropolone analogues of the amino acid mimosine. Aust. J. Chem. 32, 1329-1337 (1979)

Terpenoids and Steroids, Vol. 1 ff. A Specialist Periodical Report, London 1971 ff. The Chemical Society London

TOWERS, G.H.N., C.-K. WAT: Biological activities of polyacetylenes. Rev. Latinoamer. Chim. 9, 162-170 (1978)

TURNER, W.B.: Fungal metabolites. Academic Press, New York (1971)

UMEZAWA, H.: Cancer drugs of microbial origin. In: Methods in Cancer Research XVI, Chapter II, 43-72, Academic Press, New York (1979)

VOGT, P.K.: Focus assay or Rous sarcoma virus. In: Habel, K., N.P. Salzman (Hrsg.): Fundamental Techniques of Virology. Academic Press, New York (1969)

WALSER, J., P.F. HEINSTEIN: Mode of action of illudin S. Antimicr. Agents Chemother. 3, 357-363 (1973)

WALSH, C.T., A. SCHONBRUNN, O. LOCKRIDGE, V. MASSEY, R.H. ABELES: Inactivation of a flavoprotein, lactate oxidase, by an acetylenic substance. J. Biol. Chem. 247, 6004-6006 (1972)

WARREN, L., C.A. BUCK, G.P. TUSCINSKI: Glycopeptide changes and malignant transformation. A possible role for carbohydrate in malignant behavior.
Biochim. Biophys. Acta 516, 97-127 (1978)

WEBER, K., E. LAZARIDES, R.D. GOLDMAN, A. VOGEL, R. POLLACK: Localization and distribution of actin fibers in normal, transformed and revertant cells.
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 39, Part 1, 363-369 (1975)

WEITZEL, G., F. SCHNEIDER, A.M. FRETZDORFF, J. DURST, W.D. HIRSCHMANN: Untersuchungen zum cytostatischen Wirkungsmechanismus der Methylhydrazine. II.
Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 348, 433-442 (1967)

WERNER, H., G. LABER, E. SCHÜTZE, C. KRASEMANN, P. MAY: In vitro activity of tiamulin (81-723 HFU), a new pleuromutilin derivative, against clinically significant anaerobes.
J. Antibiotics 31, 756-760 (1978)

WERNER, R.G., K.-R. APPEL, W.M.-A. MERTL: Gunacin, a new quinone antibiotic from Ustilage spec.
J. Antibiotics 32, 1104-1111 (1979)

WOLF, H.: Kirromycin, ein Hemmstoff der Funktion der ribosomalen 30-S Untereinheit.
Dissertation Universität Tübingen (1971)

YAMAGUCHI, M., M. TANIGUCHI, I. KUBA, T. KUBOTA: Inhibitory effect of antibacterial and antitumor diterpenoids on oxidative phosphorylation in mitochondria isolated from rat liver.
Agric. Biol. Chem. 41, 2475-2477 (1977)

ZÄHNER, H.: Einige Aspekte der Antibiotika-Forschung.
Angew. Chem. 89, 696-703 (1977)

ZÄHNER, H.: The search for new secondary metabolites.
FEMS Symp. 1978, 1-17 (1978)

ZHU, G.P., J.-N. FANG, W.-J. PAN, Q.Q. YE, S.Y. WU: Adustin, a new antifungal antibiotic. I. Production, isolation and properties of adustin.
Wei Sheng Wu Hsueh Pao 18, 317-319 (1978)
(Chemical abstracts 90 : 117893t)

ZWEIG, G., J. SHERMA (Hrsg.): Handbook of Chromatography, Vol. II. CRC press, Cleveland (1972)

LEBENSLAUF

9. 3. 1951	geboren in Gießen
1957 - 1961	Grundschule in Gießen
1961 - 1963	Landgraf-Ludwig-Gymnasium Gießen
1963 - 1969	Konrad-Heresbach-Gymnasium Mettmann
6. 5. 1969	Abitur am Gymnasium Mettmann
ab WS 1969/70	Pädagogische Hochschule Wuppertal
8. 11. 1972	1. Staatsexamen für das Lehramt an Grund- und Hauptschulen
ab 1. 12. 1972	Vorbereitungsdienst für das Lehramt
18. 1. 1974	2. Staatsexamen
ab SS 1974	Biologie-Studium Universität Tübingen
25. 4. 1978	Diplomhauptprüfung in Biologie
	anschließend Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie I, Lehrstuhl Spezielle Botanik, unter Anleitung von Herrn Dr. T. Anke

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, E. Apelt, F. Bärmann, V. Braun, W. Brockhaus, H. Dahms, J. Guglielmi, G. Jung, W. Löffler, L. Löttgen, H. Meier, F. Oberwinkler, H. Probst, A. Ries, A. Rieker, R. Schönenberg, B. Schwemmle, H. Stegmann, J. Strähle, H. Sundermann, W. Teschner, H. Wolf, H. Zähner